

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**



**ACCIÓN DE LA VITAMINA D EN LA  
DIFERENCIACIÓN OSTEOCONDRA DE  
hMSCs;  
POTENCIALIDAD EN LA EVALUACIÓN DE  
BIOMATERIALES Y VEHÍCULOS  
NANOESTRUCTURADOS.**

**TESIS DOCTORAL  
VANESSA SÁNCHEZ VAQUERO  
MADRID 2013**





Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

**ACCIÓN DE LA VITAMINA D EN LA  
DIFERENCIACIÓN OSTEOCONDRALE DE  
hMSCs;  
POTENCIALIDAD EN LA EVALUACIÓN DE  
BIOMATERIALES Y VEHÍCULOS  
NANOESTRUCTURADOS.**

Memoria presentada por: VANESSA SÁNCHEZ VAQUERO  
Para optar al grado de: DOCTOR EN BIOCIENCIAS MOLECULARES  
MADRID, 2013





JOSEFA PREDESTINACIÓN GARCÍA RUÍZ, Profesora del Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, y MIGUEL MANSO SILVÁN, Profesor del Departamento de Física Aplicada de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, certifican que:

VANESSA SÁNCHEZ VAQUERO, licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid ha realizado el trabajo de investigación titulado:

**“Acción de la Vitamina D en la diferenciación osteocondral de hMSCs; Potencialidad en la evaluación de biomateriales y vehículos nanoestructurados”.**

Y para que conste a todos los efectos, firmamos el presente certificado,

En Madrid, a 28 de Octubre de 2013.

Fdo: Josefa Predestinación García Ruíz

Miguel Manso Silván

Este trabajo ha sido financiado por el Centro de Investigaciones Biomédicas en Red, Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-bbn) del Ministerio de Ciencia e Innovación Tecnológica.



***A Jose, mi marido***





## ***Agradecimientos***



Estas páginas serán lo último que escriba de esta tesis pero antes de despedirme me gustaría agradecer a todas las personas que directa o indirectamente me han ayudado a nivel experimental o sencillamente haciéndome la vida más agradable en el laboratorio.

*“...En un buen ambiente de trabajo la probabilidad de que salgan los experimentos es superior...”*

En primer lugar quería dar las gracias a la profesora y Dra. Josefa Predestinación García Ruiz por todo lo que me ha enseñado, por su ayuda y dedicación a lo largo de estos años. Gracias por abrirme las puertas del laboratorio para realizar la BEXPA y después seguir trabajando para llevar a buen puerto este proyecto de tesis sobre el que hemos estado trabajando.

Muchas gracias al Dr. Miguel Manso por confiar en mí y dejarme que probara todos sus biomateriales y los del resto de compañeros físicos... Ha sido un gran apoyo durante todo este camino que llevo recorriendo estos años, gracias por la atención y amabilidad que has mostrado a lo largo de la tesis, por tus consejos a la hora de planificar experimentos y por enseñarme un poquito más sobre la Física.

Y como no... ¡a mis compañeras de laboratorio!

Laura, empezamos juntas en este mundillo de la investigación realizando el proyecto fin de carrera y por cosas del azar creo que vamos a acabar también juntas leyendo la tesis...en fin, ¡así es la vida! Gracias por todos esos momentos que hemos compartido juntas, por ayudarme y estar conmigo hasta el final, por alegrarme en los días de bajón con un chiste sevillano aunque fuera muy malo... En definitiva, hemos compartido momentos profesionales y personales muy buenos y espero poder seguir haciéndolo. Gracias por ser mi amiga.

Carmen, al principio creo que no habíamos congeniado mucho pero el tiempo me dio a entender que eras una grandísima persona y una muy buena compañera. Gracias por atender todas mis dudas, por enseñarme todas las técnicas, dejarme tus protocolos y sobre todo por abrirme los ojos en este bonito pero duro mundo de la investigación. Gracias por todo este tiempo que hemos pasado juntas y el que nos queda por pasar, no lo dudes.

Chus, cuando llegué al laboratorio para hacer el proyecto fin de carrera sabía que estabas haciendo la tesis porque escuchaba hablar de ti pero la verdad es que no tuve mucho tiempo de verte ni de conocerte... pero este trabajo te da tiempo para todo y a mí me ha

## ***Agradecimientos***

---

servido para ver que eres una gran compañera y una mejor persona, has dado tu ayuda siempre sin pedírtela, has estado disponible aunque llegaras exhausta del otro laboratorio (*un cafetón por favor...*), me has apoyado en esos momentos de flaqueza... por todo esto y más, gracias.

Vosotras habéis sido mis compañeras de fatiga, gracias por haber estado siempre ahí. Entré sola en el C-X y ahora tengo 3 grandes amigas.

Al resto de compañeras que han ido pasando por el labo: Nuria, Paloma y Ana... por compartir esos pequeños momentos pero que han sido muy gratificantes, la verdad.

Gracias a toda la gente del Departamento de Física Aplicada: Vicente, Darío, Esther, Luis, Gonzalo, Raúl, Jacobo, Nelson... que de una u otra manera me habéis ayudado, y sobre todo, a mi compañero Álvaro. Siempre has estado con una sonrisa aunque las cosas no funcionaran... pero bueno, no seamos pesimistas, por lo menos siempre nos quedarán los resultados publicados, ¿no? o eso nos decían... Gracias por formar parte de mis amigos.

A mi compañera del CIBER, Myriam, gracias por todos los materiales que nos preparaste y sobre todo por compartir esos buenos momentos que nos hiciste pasar. Gracias por todo. También a Fabio Formosa, a Andrés Díaz Lantada y a M<sup>a</sup> Dolores Ynsa por dejarnos pobrar sus materiales.

A los vecinos de al lado: Filip, Vega, Anita, Diana, Alicia, Thorsten y Henna. Y como no, a Juan (cultivos), siempre disponible para preparar los medios en el menor tiempo posible; a Javier Palacín, por suministrarnos alguna ratita cuando necesitábamos células; a M<sup>a</sup> Ángeles, Verónica, Maite, Lola, Ana... por ayudarme con los diferentes microscopios.

A la Dra. Isabel Guerrero por acogerme en su laboratorio en la recta final de la tesis. Gracias por la atención prestada y por todo lo que he aprendido estando allí. A Carmen I, por ser una grandísima persona y trabajadora como ninguna, por todos esos buenos momentos que me has hecho pasar y por todo lo que me has enseñado, siempre recordaré tu *¡¡maravilloso, maravilloso...!!*, y al resto de compis del 414: Citlali, Irene, David, Joao, Eleanor, Rosana, Nicole, Jaime, Julia, Inés y Pau.

A todos mis amigos en general... en especial a Cris, mi gran amiga, gracias por estar siempre ahí, a Miriam y Vicky; Paco, Elena y Sara; Isa y Jaime; Lorena, Tomás y ya a Víctor! ahora tendré un poquito más de tiempo para vosotros, ¡lo prometo!

Pero en estos agradecimientos no puedo olvidarme del principal pilar en mi vida, Jose... mi marido, mi compañero, mi amigo, mi todo... la persona que más me ha apoyado a lo largo de todo este camino, siempre me ha hecho ver el lado positivo de las cosas (*"no veas el vaso medio vacío, sino medio lleno..."*), ha conseguido hacerme reír en esos momentos en los que no podía ser, me ha ayudado siempre de una manera o de otra, ha hecho todo lo que ha estado en sus manos... por todo esto, MIL GRACIAS!

Y para terminar, toda mi familia en general (no puedo nombrarlos a todos porque necesitaría un par de páginas más...), tíos, primos y primillos, mi hermana Mónica y mi cuñado Fran. A mis suegros, Jose y Loli, por estar siempre pendientes de mí. A mis cuñados Loli y Antonio, por hacerme pasar muy buenos ratos y olvidarme un poco de la rutina...

Y sobre todo, a mis padres, Agustín y Laura. Son los que me han animado hasta el final para hacer lo que verdaderamente me gustaba por difícil que fuera, me han apoyado en los malos momentos y han compartido los buenos. En definitiva, son los que han vivido de cerca lo complicado que es este mundo de la investigación. Muchas gracias por estar siempre ahí, y no fallarme, cuando os he necesitado.

**A TODOS VOSOTROS...**

**¡¡¡MUCHÍSIMAS GRACIAS!!!**



## ***Resumen***





La osificación endocondral es un proceso de varias etapas conducente a la formación de la mayoría de los huesos del esqueleto. Tiene lugar durante el desarrollo, el crecimiento del individuo, interviene en la remodelación activa del esqueleto, en la reparación después de un insulto y en la regeneración ósea. El hueso no es un tejido estático. A lo largo de la vida se renueva de forma continua, siendo sustituido en su totalidad cada 10 años aproximadamente en el hombre adulto. Con la edad, se produce una osteopenia que conduce a la pérdida de masa ósea y que puede provocar la osteoporosis. Una de las hormonas que juega un papel fundamental, y de la cual se sabe que está descrita su acción en el esqueleto óseo, es la Vitamina D (VD). Los resultados de este trabajo demuestran que la VD reduce la velocidad de proliferación de las células madre humanas mesenquimales, y además, es la responsable de la morfología celular del citoesqueleto. Es capaz de modular la adhesión celular y los genes implicados en la diferenciación osteocondral, la actividad de la fosfatasa alcalina y los factores de transcripción del metabolismo óseo, todo en presencia de prolactina y estrógenos. También se demuestra la participación de la VD en la regulación de la vía Jak-STAT.

El tratamiento de los defectos óseos ha sido objeto de controversia durante siglos. El proceso de remodelado es vital para el mantenimiento del sistema esquelético ya que, como resultado de las tensiones y fuerzas a las que está sometido normalmente, acumula microfracturas que han de ser reparadas. Estas áreas dañadas son detectadas y se inicia localmente el proceso de remodelado para su reparación. Para ello se ponen en marcha mecanismos osteoformadores con la finalidad de restaurar el tejido óseo en el lugar de la lesión. Habitualmente, la dinámica del hueso es suficiente para reconstruir los defectos comunes, no obstante, en las pérdidas mayores de masa tisular se hace necesario recurrir al aporte de sustitutivos óseos para obtener la reparación. Por eso, en este trabajo nos hemos centrado en estudiar las células madre humanas mesenquimales y en analizar su comportamiento sobre diferentes soportes de biomateriales. Los resultados sugieren que las células son capaces de diferenciar las múltiples superficies estudiadas como demuestran los cambios morfológicos y de proliferación. Las microesferas de policaprolactona y quitosano permitieron llevar a cabo estudios de condrogénesis, y los materiales micro y nano particulados, como las partículas de silicio poroso infiltradas con cobalto, demostraron no ser citotóxicos para el cultivo celular.



## ***Summary***



The endochondral ossification is a multistep process leading to the formation of most of the bones of the skeleton. It takes place during development, the growth of the individual, involved in active skeletal remodeling, repairing after an insult and during bone regeneration. The bone is not a static tissue. Throughout life bone is continuously renewed, being entirely replaced every 10 years in the adult male. With age, osteopenia occurs leading to bone loss and can cause osteoporosis. A hormone that plays a fundamental role, and which is known to act on the skeleton, is Vitamin D (VD). The results of this study demonstrate that VD reduces the rate of proliferation of human mesenchymal stem cells, and further, is responsible for cell morphology cytoskeleton. Is capable of modulating cell adhesion and genes involved in osteochondral differentiation, ALP activity and transcription factors of bone metabolism, in the presence of estrogen and prolactin. The involvement of the VD in the regulation of the Jak-STAT pathway is also demonstrated.

The treatment of bone defects has been the subject of controversy for centuries. The remodeling process is vital to the maintenance of the skeletal system and, as a result of the stresses and forces to which it is subjected, normally accumulates microfractures that must be repaired. These damaged areas are detected and the process of remodeling for repair starts locally. Osteoforming mechanisms are implemented in order to restore bone tissue at the site of injury. Typically, the dynamics of bone is sufficient to reconstruct common defects, however, greater losses in tissue mass require the supply of a bone substitute. Therefore, in this work we have focused on studying the human mesenchymal stem cells and analyzing their behavior on different biomaterial supports. The results suggest that the cells are able to differentiate the various surfaces studied as evidenced by morphological changes and proliferation. Polycaprolactone and chitosan microspheres allowed carrying out studies of chondrogenesis, and micro and nano particulate materials, such as cobalt infiltrated in porous silicon particles, proved not to be cytotoxic to the cell culture.



## ***Índice***





AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	IX
SUMMARY	XIII
ÍNDICE	3
ABREVIATURAS	11

## **1. INTRODUCCIÓN**

<b>1.1 El esqueleto de los vertebrados</b>	<b>17</b>
1.1.1 Formación del tejido óseo	17
1.1.2 Células del hueso	19
1.1.3 MSCs aisladas de médula ósea	20
1.1.4 Reparación ósea	21
1.1.5 Nichos en la médula ósea	22
1.1.6 Transición epitelio-mesénquima	23
<b>1.2 La vitamina D y su receptor</b>	<b>24</b>
1.2.1 Aspectos generales de los receptores nucleares	24
1.2.2 El receptor de la Vitamina D	24
1.2.3 Mecanismo de acción del VDR	26
1.2.4 Acción de la VD en el esqueleto óseo	27
1.2.5 Acción de las hormonas prolactina y estrógenos en el esqueleto óseo	27
<b>1.3 Biomateriales utilizados en ingeniería de tejidos.</b>	
<b>Micro- nanotecnologías y nanomedicina</b>	<b>28</b>
1.3.1 Células madre, MSCs	29
1.3.2 Factores tróficos	30
1.3.3 Biomateriales	30

<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>3.1 Técnicas de cultivo celular</b>	<b>39</b>
3.1.1 Células mesenquimales humanas	39
3.1.2 Tratamiento de las placas de cultivo celular con gelatina	39
3.1.3 Ensayos de proliferación	40
3.1.3.1 Incorporación de [ <sup>3</sup> H]-timidina	40
3.1.3.2 Determinación de Ki67 mediante inmunocitoquímica	40
3.1.4 Ensayos de diferenciación osteocondral	41
3.1.5 Ensayos de diferenciación condrogénica	41
3.1.6 Ensayos de citotoxicidad	42
<b>3.2 Inmunocitoquímica y microscopías</b>	<b>42</b>
3.2.1 Inmunocitoquímica y microscopía de fluorescencia	42
3.2.2 Análisis de los complejos de diferenciación ósea en los speckles nucleares mediante microscopía confocal	44
<b>3.3 Técnicas de Biología Molecular</b>	<b>45</b>
3.3.1 Extracción de RNA total	45
3.3.2 Tratamiento con la DNasa libre de RNasa	45
3.3.3 Medida de la concentración de RNA final	45
3.3.4 Diseño de oligonucleótidos	46
3.3.5 RT-PCR	47
3.3.6 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes	48
<b>3.4 Tinciones celulares</b>	<b>48</b>
3.4.1 Fosfatasa alcalina	48
3.4.2 Hematoxilina-Eosina	48
<b>3.5 Estudio de biomateriales</b>	<b>49</b>
3.5.1 Análisis de la superficie de biomateriales por las hMSCs aisladas de médula ósea	49
3.5.1.1 Policaprolactona con estructura honeycomb (PCLhc)	49

3.5.1.2 Estudios con Silicio–Silicio Poroso (Si/SiP)	50
A/ Patrones de Si/SiP	
B/ Partículas de SiP	
3.5.1.3 Soportes de Polietilenglicol–Polietilenglicol diacrilato con nanopartículas de Ti (PEG-PEGd-Ti)	52
3.5.1.4 Hidrogeles híbridos de agarosa–3- aminopropiltrietoxisilano (APTS)	53
3.5.1.5 Scaffolds de resina epoxi recubiertos con Diamond Like Carbon (DLC)	53
3.5.1.6 Cultivo de hMSCs en microesferas para condrogénesis	54

#### **4. RESULTADOS**

##### **Acción de la VD en las células progenitoras de hueso aisladas de médula ósea**

<b>4.1 La VD reduce la velocidad de proliferación de las hMSCs</b>	<b>59</b>
<b>4.2 La VD es responsable de la morfología celular de las hMSCs regulando el citoesqueleto</b>	<b>62</b>
<b>4.3 Expresión y localización del VDR en las hMSCs</b>	<b>66</b>
<b>4.4 ¿Modula la VD la acción proliferativa inducida por la prolactina y los estrógenos?</b>	<b>66</b>
4.4.1 La VD modula genes implicados en la diferenciación osteocondral	67
4.4.2 La VD modula la expresión de la ALP	69
4.4.3 La VD en la adhesión celular	70
4.4.4 Estudio de la expresión del VEGF en presencia de VD	72
4.4.5 Expresión y localización de los factores de transcripción Runx2, Sox9 y RXRα específicos de las hMSCs y de la diferenciación ósea	73
4.4.6 Expresión de los factores de transcripción c/EBPα, c/EBPβ	

y GR implicados en el metabolismo energético	76
4.4.7 En la interacción de VDR con STAT5	79
4.4.8 En estudios de colocalización de la VD en la regulación de la vía JAK-STAT	81
 <b><u>Análisis de la superficie de biomateriales por las hMSCs aisladas</u></b>	
<b><u>de médula ósea</u></b>	
<b>4.5 Análisis de los cambios morfológicos de las hMSCs sobre las superficies de biomateriales</b>	<b>84</b>
4.5.1 Soportes de Silicio/Silicio Poroso (Si/SiP)	85
4.5.2 Soportes de polietilenglicol–polietilenglicol diacrilato con nanopartículas de titanio (PEG-PEGd-Ti)	88
4.5.3 Hidrogeles híbridos de agarosa–3-aminopropiltriethoxisilano (APTS)	90
4.5.4 Andamios de resina epoxi recubiertos con Diamond Like Carbon (DLC)	93
<b>4.6 Aproximación a los cultivos 3D con hMSCs</b>	<b>97</b>
4.6.1 Andamios 3D recubiertos con DLC	97
4.6.2 Andamios de policaprolactona con estructura honeycomb (PCLhc)	99
<b>4.7 Estudios de condrogénesis de hMSCs con microesferas</b>	<b>103</b>
<b>4.8 Estudio de la tasa de proliferación de las hMSCs</b>	<b>105</b>
4.8.1 Hidrogeles de agarosa-APTS	105
4.8.2 Soportes de Si/SiP	106
4.8.3 Soportes de PEG-PEGd-Ti	107
<b>4.9 Análisis toxicológicos de materiales micro y nano particulados</b>	<b>108</b>
4.9.1 Análisis toxicológicos de partículas de SiPCo con las hMSCs	108
 <b>5. DISCUSIÓN</b>	 <b>113</b>
 <b>6. CONCLUSIONES</b>	 <b>125</b>

<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>129</b>
<b>8. ANEXO</b>	<b>145</b>



## ***Abreviaturas***





**AF-1 ó 2:** Activación de Función- 1 ó 2

**AFM:** Microscopía de Fuerzas Atómicas

**ALL:** Alilamina

**ALP:** Fosfatasa alcalina

**APTS:** 3-Aminopropiltrietoxisilano

**ATP:** Adenosín Trifosfato

**BSA:** Albúmina de Suero Bovina

**BrEt:** Bromuro de Etidio

**c/EBP $\alpha$  y  $\beta$ :** Proteína  $\alpha$  y  $\beta$  de unión al enhancer CCAAT

**CHT:** Quitosano

**Col:** Colágeno

**Col II:** Colágeno tipo II

**Dex:** Dexametasona

**DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol

**DBD:** DNA Binding Domain

**DBP:** Vitamin D Binding Protein

**DLC:** Diamond Like Carbon

**DMEM:** Medio de Eagle modificado por Dulbecco

**DMEM-LG:** Medio de Eagle modificado por Dulbecco bajo en glucosa

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**dNTPs:** Dexosirribonucleótidos trifosfato

**DTT:** Ditioneitol

**E:** Estrógenos

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetracético

**EGTA:** Ácido etilenglicoltetracético

**EMT:** Epithelium-Mesenchyme Transition

**ER $\alpha$  y  $\beta$ :** Receptor de Estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$

**FBS:** Suero Fetal Bovino

**FDA:** Diacetato de fluoresceína

## ***Abreviaturas***

---

**GR:** Receptor de Glucocorticoides

**H<sub>2</sub>O MILLIQ:** Agua destilada

**H<sub>2</sub>O-DEPC:** Agua dietilpirocarbonato

**HE:** Hematoxilina y Eosina

**HEPES:** 4-(2-hidroxietil)-1-etano-sulfónico piperazina

**HF:** Ácido fluorhídrico

**HiF-1 $\alpha$ :** Factor inducible por Hipoxia 1 alpha

**hMSCs:** Células Madre Mesenquimales humanas

**HRES:** Elementos de Respuesta a Hormonas

**HSC:** Células Madre Hematopoyéticas

**IL-6:** Interleuquina-6

**ITS:** Insulina, Transferrina y Selenio

**LBD:** Ligand Binding Domain

**MC:** Medio de Crecimiento

**MEC:** Matriz Extracelular

**MET:** Mesenchyme-Epithelium Transition

**MTT:** [3-(4.5-dimethylthiazol -2-yl)-2-5-diphenylterazolum bromide]

**NP-40:** Nonidet P-40

**NR:** Receptor Nuclear

**OC:** Osteocalcina

**O/N:** Overnight

**OP:** Osteopontina

**OPG:** Osteoprotegerina

**P:** Prolactina

**PBS:** Tampón Fosfato Salino

**PBSA:** PBS + Albúmina de Suero Bovina

**PCL:** Policaprolactona

**PCLhc:** Policaprolactona con estructura "honeycomb"

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**PE-CVD:** Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition

**PEG:** Polietilenglicol

**PEG-PEGd-Ti:** Polietilenglicol - Polietilenglicol-diacrilato con nanopartículas de titanio

**PFA:** Paraformaldehído

**Ph488:** Faloidina

**PMSF:** Fenilmetilsulfonilfluoruro

**PNPMA:** Poly[neopentyl methacrylate)-block-(methacrylic acid)] diblock-copolymer

**PR:** Receptor de Prolactina

**PTH:** Hormona Paratiroide

**RNA:** Ácido ribonucleico

**rpm:** Revoluciones por minuto

**RT:** Temperatura Ambiente

**RT-PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa a partir de la RetroTranscripción del ARNm

**RXR:** Receptor X Retinoide

**SDS:** DodecilSulfato Sódico

**SEM:** Microscopía Electrónica de Barrido

**SiP:** Silicio Poroso

**SiPCo:** Partículas micrométricas de Silicio Poroso que integran Cobalto nanoscópico

**SiPCoPEG:** Partículas micrométricas de Silicio Poroso recubiertas de polietilenglicol que integran Cobalto nanoscópico

**STAT 1,3 y 5:** Proteína Señal de la Transducción y Activación de la señal 1, 3 y 5

**TBE:** Tris Borato y EDTA

**TE:** Tris HCl y EDTA

**TGF-  $\beta$ :** Factor de Crecimiento Transformante Beta

**TIPT:** Isopropóxido de Titanio

**UV:** Luz/Exposición Ultravioleta

**VD:** Vitamina D

**VDR:** Receptor de Vitamina D

**VDRE:** Elemento de Respuesta a Vitamina D

**VEGF:** Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular

**VEGFR:** Receptor del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular



## ***1. Introducción***



## **1.1 EL ESQUELETO DE LOS VERTEBRADOS.**

La gran mayoría de los animales poseen un armazón sólido que les da sostén y protección, y esta estructura, generalmente dura y mineralizada, recibe el nombre de esqueleto o sistema esquelético (Lefebvre *et al.*, 2010). En los vertebrados, consta del conjunto total y organizado de los huesos, y las funciones más importantes en el organismo son: posibilitar la acción mecánica de los músculos; proteger órganos vitales como el corazón o el cerebro y albergar la médula ósea; servir como depósito metabólico de almacenamiento de calcio, fósforo y otros iones, necesaria para mantener la homeostasis esencial del organismo (Mackiewicz *et al.*, 2011) y contribuir a la formación de las células sanguíneas.

El esqueleto tiene una amplia capacidad de regeneración y se ha estimado que en humanos es remplazado totalmente cada diez años. Está constituido principalmente por tejido óseo, un tipo especializado de tejido conectivo formado por células y componentes extracelulares calcificados. Su composición química consta de agua, minerales (como fosfato y carbonato de calcio) y materia orgánica (principalmente colágeno y otras proteínas). Así podemos señalar que los componentes inorgánicos representan un 65% del peso óseo y tan sólo un 35% es orgánico. Los huesos también poseen cubiertas de tejido conectivo (periostio) y cartílago, vasos y nervios. En el interior de los huesos encontramos un tipo de tejido denominado médula ósea donde se produce la sangre (hematopoyesis). Efectivamente, contiene las células madre que originan los tres tipos de células sanguíneas (leucocitos, hematíes y plaquetas) y es conocida como médula roja. También encontramos la médula ósea amarilla, que es la perteneciente al tejido adiposo. Dado el ámbito de la presente tesis, en las próximas secciones profundizaremos en la descripción de las células ligadas al hueso.

### **1.1.1 Formación del tejido óseo.**

Durante el desarrollo embrionario, la formación del hueso ocurre de dos formas diferentes: por osificación intramembranosa y por osificación endocondral, siendo la principal diferencia entre ellas la presencia de cartílago.

La osificación intramembranosa se limita a los huesos que no tienen función de sostén estructural como por ejemplo, los huesos planos del cráneo, la mandíbula y la escápula (Franz-Odenaal, 2011). Se caracteriza por la formación de tejido óseo sin usar cartílago hialino como molde. En este tipo de osificación se forma el hueso por diferenciación de células mesenquimales en osteoblastos (sintetizan la matriz ósea) y depositan matriz osteoide no mineralizada. Posteriormente se deposita fosfato cálcico y sales minerales que

endurecen la matriz ósea. Mientras se produce la calcificación de la matriz ósea, aparecen las trabéculas óseas que se unen dando lugar al hueso esponjoso, y este se recubre por cada uno de sus lados, por placas de tejido óseo compacto. Una vez formado, el hueso plano crece de tamaño mediante la adición de más hueso por los bordes.

La osificación endocondral es la sustitución de cartílago por hueso (Mackie *et al.*, 2011). Es un proceso lento que culmina cuando el hueso alcanza el tamaño definitivo y completa el crecimiento, y se puede apreciar mejor en los huesos más largos como tibia, fémur y húmero. La osificación endocondral consta de varios pasos. En primer lugar, se desarrolla un modelo cartilaginoso, que es el sitio donde las células mesenquimales se agrupan para formar el futuro hueso. Las células se diferencian a condroblastos y producen matriz cartilaginosa. También se desarrolla el pericondrio, una membrana alrededor del modelo cartilaginoso. En segundo lugar se produce el crecimiento de este modelo. Casi todos los huesos del cuerpo se forman a partir de estructuras cartilaginosas en las que la osificación se extiende desde el centro hasta los márgenes. Al depósito de matriz sobre la superficie cartilaginosa, la cual hace incrementar el grosor del cartílago se le llama crecimiento aposicional. Al mismo tiempo, la división celular de los condrocitos seguida de la secreción de sustancias que forman la matriz resulta en un crecimiento intersticial, generando un aumento de longitud. En tercer lugar, a partir del modelo cartilaginoso se desarrolla un periostio (el pericondrio empieza a formar tejido óseo) y, en el centro se desarrolla un collar óseo, en el que los osteoblastos (que se han diferenciado a partir de condrocitos) depositan hueso. Poco después de la aparición del collar óseo, el cartílago comienza a calcificarse formándose un centro de osificación primario al penetrar un vaso en el centro de la diáfisis, una masa sólida de cartílago hialino. Simultáneamente a la osificación endocondral que avanza desde la diáfisis hacia las epífisis, creciendo el hueso en longitud, se forma la cavidad medular. En cuarto lugar, la diáfisis es sustituida por hueso compacto, cuyo centro contiene la cavidad medular que se llena de médula ósea roja. Cuando los vasos sanguíneos penetran en la epífisis, se forma un centro de osificación secundario, a partir del cual el proceso de osificación es similar al del centro primario. Estos centros de osificación secundarios suelen aparecer en el momento del nacimiento, con la diferencia de que se forma hueso esponjoso y no se desarrolla una cavidad medular. La osificación se inicia en el centro de la epífisis y prosigue hacia el exterior, en dirección a la superficie externa del hueso. En quinto lugar, en los extremos de las epífisis queda una porción remanente de cartílago constituyendo el cartílago articular, y entre las epífisis y la diáfisis se mantiene la placa epifisaria o de crecimiento, también cartilaginosa, que es la que permite el crecimiento longitudinal de los huesos largos hasta que desaparece en la edad adulta cuando éstos alcanzan su dimensión definitiva.



### **1.1.2 Células del hueso.**

En el tejido óseo maduro y en desarrollo se pueden diferenciar cuatro tipos de células: osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Los tres primeros tipos son estadios funcionales de un único tipo celular, mientras que los osteoclastos tienen un origen hematopoyético compartido con el linaje mononuclear-fagocítico. Veamos con más de detalle las células del hueso.

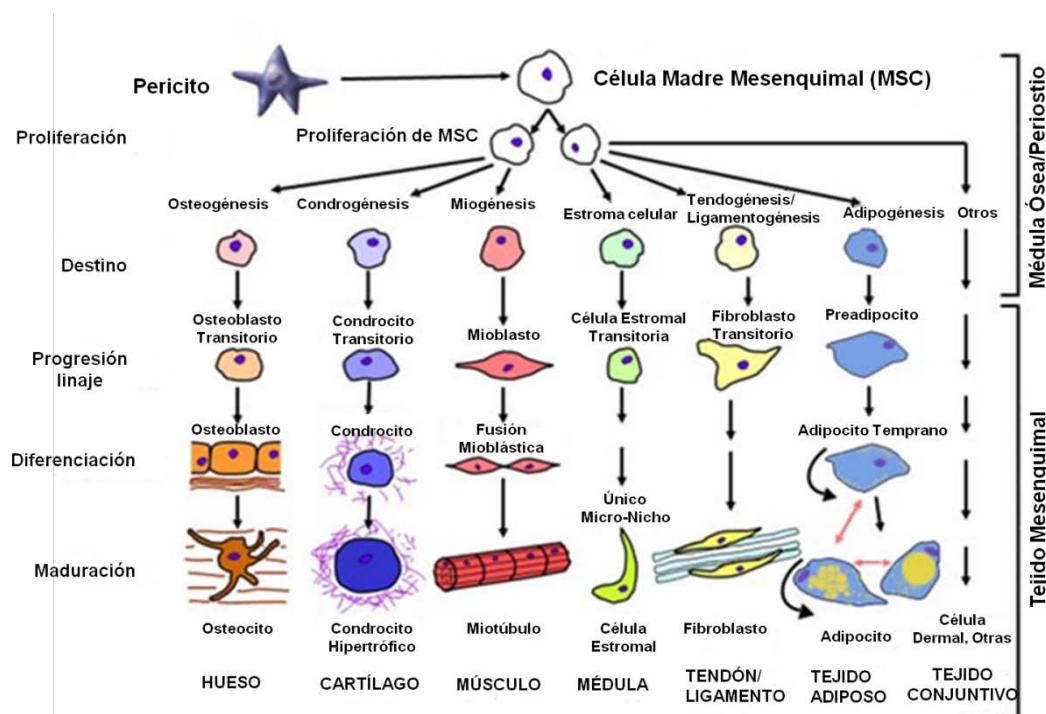
- Células osteoprogenitoras: Son células no especializadas derivadas del mesénquima que pueden experimentar proliferación y diferenciación durante el desarrollo del esqueleto/remodelación/reparación. Existe un progenitor para las células progenitoras de hueso y las células hematopoyéticas.
- Osteoblastos: Proceden de células osteoprogenitoras provenientes del periostio y en la médula ósea son inducidas a la diferenciación a través de distintas proteínas morfogenéticas del hueso. Son células diferenciadas sintetizadoras del tejido óseo, por lo que están involucradas en el desarrollo y el crecimiento de los huesos, o lo que es lo mismo, en la remodelación del hueso. También son responsables de la calcificación de la matriz mediante la secreción de pequeñas vesículas matriciales las cuales tienen gran cantidad de fosfatasa alcalina. El desarrollo de los osteoblastos se ve influenciado por distintos factores que estimulan su formación como la hormona paratiroidea (PTH) y la vitamina D (VD). Los osteoblastos se comunican con otros osteoblastos y con osteocitos por medio de prolongaciones citoplasmáticas o nexos, para establecer comunicación con el tejido óseo.
- Osteocitos: Son células que se forman, según parece, a partir de la diferenciación de los osteoblastos. Quedan rodeados de matriz extracelular y conectados entre sí y con el resto de células óseas mediante prolongaciones citoplasmáticas y uniones comunicantes célula-célula, célula-matriz extracelular, los canalículos Haversianos y canales de Volkmann. Se está postulando que el osteocito es la célula mecanosensora del tejido óseo.
- Osteoclastos: Son células multinucleadas de gran tamaño cuya función es la resorción ósea. Derivan de células hematológicas y se localizan en las superficies óseas firmemente asociadas a la matriz ósea. La salud del tejido óseo depende de la limpieza de células muertas realizada por los osteoclastos. Después de la acción osteoclástica aparecen las células cuboides derivadas de los osteoblastos. Los factores reguladores de la osteoclastogénesis son muchos y entre ellos la PTH, la VD, la calcitonina y glucocorticoides.

### 1.1.3 MSCs aisladas de médula ósea.

En el interior de los huesos largos encontramos la médula ósea, donde coexisten las células madre hematopoyéticas (HSCs), las cuales darán lugar a las células que forman la sangre y el sistema inmune, y las células madre mesenquimales (MSCs), responsables de la formación del esqueleto. Una célula madre o más adecuadamente denominada troncal, es aquella que según *“The International Society for Cellular Therapy”* cumple los siguientes criterios distintivos mínimos (Dominici *et al.*, 2006):

- poseer la habilidad a adherirse al plástico en cultivo (inicialmente descritas como unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F) (Friedenstein A 1989)).
- Presentar expresión o ausencia de una variedad de marcadores de superficie (positivos para: CD105, CD73, CD90 y negativos para: CD34, CD45, CD14 o CD11b, CD97α o CD19, HLA-DR).
- Tener la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos *in vitro* (Bianco *et al.*, 2001).

Las MSCs tienen la habilidad de renovarse y proliferar durante generaciones sin pérdida significativa de sus características (Cancedda *et al.*, 2003). La existencia de este tipo de células permite mantener la capacidad regenerativa de los tejidos. Aunque las células se pueden obtener de diferentes tejidos, una de las fuentes más utilizadas es el estroma de la médula ósea (Pittenger *et al.*, 1999). Por eso, las MSCs son células del estroma pluripotenciales que tienen amplia capacidad de diferenciación en múltiples líneas celulares (hueso, cartílago, músculo, estroma, tendón/ligamento, tejido adiposo y tejido conectivo (Caplan *et al.*, 2006)) (Esquema 1), plasticidad y potencial inmunosupresor, lo que las hace una herramienta de gran importancia en las terapias celulares.



**Esquema 1.** El proceso mesengénico donde las MSCs son capaces de diferenciarse a hueso, cartílago, músculo, médula, tendón/ligamento, tejido adiposo y otros tejidos conectivos (Caplan and Correa 2011).

#### 1.1.4 Reparación ósea.

Las MSCs son las encargadas de formar la mayor parte del esqueleto durante la embriogénesis (Caplan *et al.* 1991). El papel principal de las células madre adultas en un organismo vivo es mantener y reparar el tejido en el que se encuentran. Existen diversas fuentes de células que se pueden utilizar para la reparación y regeneración tisular: células madre del paciente, células madre adultas como las de la médula ósea y células embrionarias o células germinales (Vats *et al.*, 2004; Caplan *et al.* 2008). En este trabajo nos centramos en el caso de MSCs, ya que juegan un papel fundamental en el mantenimiento de los tejidos y proporcionan la capacidad de reparación y regeneración tisular (Otto *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2012; Kon *et al.*, 2012). Además son las células idóneas para estudiar los mecanismos moleculares de la diferenciación osteocondral y la terapia celular en enfermedades degenerativas, lo que les da un valor clave añadido. Las MSCs parecen actuar como reservorios de células de reparación en el cuerpo humano, sin poseer previamente las características específicas de un tejido. Diferentes señales pueden movilizarlas y diferenciarlas en líneas de tejido conectivo. Estas señales incluyen daño en los tejidos como traumatismos, fracturas, inflamación, necrosis y tumores (Pountos *et al.*, 2005).

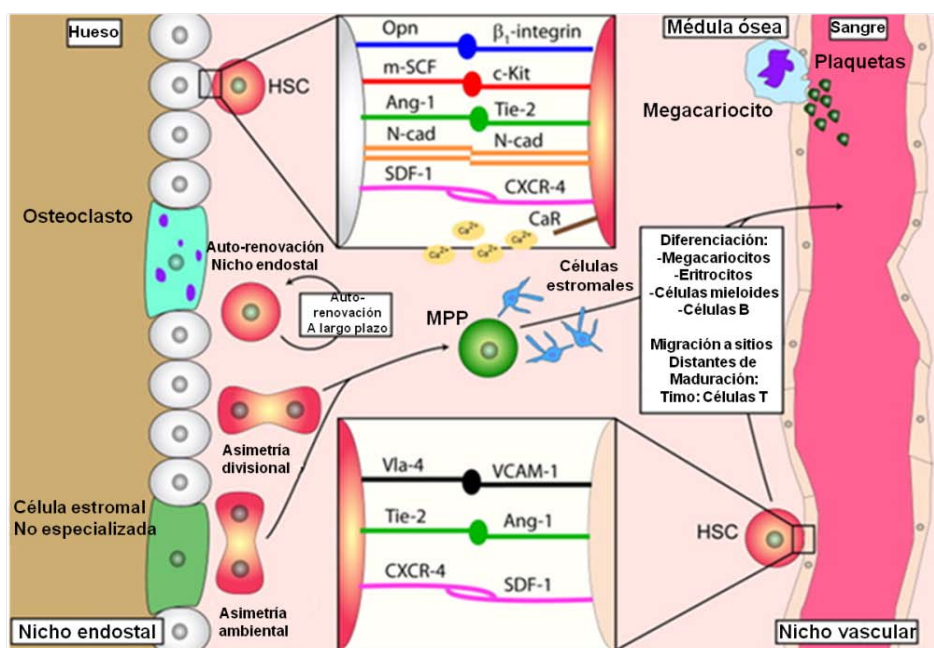
### 1.1.5 Nichos en la médula ósea.

Hay investigaciones que sugieren que las células madre mesenquimales de varios tejidos residen en un nicho perivascular por lo que son identificadas como células perivasculares o pericitos (Da Silva Meirelles *et al.*, 2008) (Esquema 2). Los pericitos rodean los vasos sanguíneos dentro de diversos tejidos (Crisan *et al.*, 2008; Zannettino *et al.*, 2008), conduciendo a la suposición de que el nicho perivascular es un microambiente de las células madre común para las poblaciones de MSCs (Arthur *et al.*, 2009; Caplan *et al.*, 2009). El origen embrionario de los pericitos los hace pertenecer a una estirpe de células pluripotentes y anatómicamente reconocible. En los últimos años ha recibido un creciente interés por mantenerse en estado indiferenciado como un tipo de célula madre. Sin embargo, existen escasas pruebas experimentales que muestren la diferenciación de pericitos en diferentes tipos de células (Caplan *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2010). Lo que es de mayor interés, es que las MSCs son de origen perivascular, un hecho que podría explicar la presencia de estas células en los diferentes tejidos (Sacchetti *et al.*, 2007; Crisan *et al.*, 2008).

Al hablar de células madre, es necesario delimitar el lugar donde se encuentran, ya que este no sólo les proporciona un ambiente donde permanecer y las condiciones para su subsistencia, sino que también desarrolla con las células una comunicación directa a través de sustancias químicas que determinarán el destino de las células madre. El microambiente local (Otto *et al.*, 2004; Ippokratis *et al.*, 2005) puede también jugar un papel importante en el destino de las células madre mesenquimales y recibe el nombre de nicho. En 1978, Schofield propuso una hipótesis según la cual las células madre se encuentran asociadas con otras células que determinan su comportamiento y son las que forman el nicho. Utilizando diferentes marcadores fenotípicos para células madre hematopoyéticas y progenitoras, muchos grupos han intentado definir la ubicación del nicho basado en sus constituyentes celulares (Ellis *et al.*, 2011). Se sabe que es un espacio microanatómico que contiene moléculas reguladoras de señalización dentro de la médula ósea y se han identificado para las HSCs dos tipos de nicho: el nicho endostal y el nicho vascular. El nicho endostal u osteoblástico sugiere que las HSCs están cerca o en contacto con osteoblastos (Calvi *et al.*, 2003; Visnjic *et al.*, 2004), y el nicho vascular sugiere que las HSCs están en contacto con el endotelio sinusoidal (Kiel *et al.*, 2005). Se cree que el nicho vascular forma un ambiente que promueve la proliferación, diferenciación y la trans migración endotelial de las HSCs, mientras que el nicho endostal promueve la quiescencia y la autorrenovación. El mecanismo preciso de esta interacción entre las HSCs y el microambiente local se desconoce. En consecuencia, podemos resumir que el nicho hematopoyético está dividido en tres partes tal y como refleja el Esquema 2: 1) la zona osteoblástica, localizada cerca del hueso. 2) Zona medular, donde

están las HSCs quiescentes y proliferantes y 3) zona perivascular (cerca de los vasos sanguíneos) donde ocurre la salida de las células maduras a circulación (Kiel *et al.*, 2005).

La función del nicho es la de regular la proliferación, la movilización y la autorrenovación de las HSCs, lo cual se realiza a través de mecanismos complementarios como la producción de moléculas de señalización y la regulación del medio fisicoquímico entre otros.



**Esquema 2.** La médula ósea y el nicho hematopoyético (Li Calzi *et al.*, 2010).

### 1.1.6 Transición epitelio-mesénquima.

El desarrollo de órganos y de tejidos adultos surge a través de la transición epitelio-mesénquima (EMT, del inglés *Epithelium-Mesenchyme Transition*) (Kalluri *et al.*, 2009). Es un evento que sucede durante el desarrollo de los vertebrados y se produce por conversión de células epiteliales en células mesenquimales. Es un proceso complejo y generalmente reversible (*Mesenchyme-Epithelium Transition*, MET). También contribuye a la regeneración de los tejidos. No obstante, puede ser reactivada en condiciones patológicas, y puede ser causa de fibrosis en distintos órganos y promover la progresión e invasión tumoral (Lim *et al.*, 2012). La transición EMT comienza con la rotura de las uniones intercelulares y la pérdida de polaridad ápico-basal de las células epiteliales. Además adquieren características migratorias e invasivas, inducen propiedades de células madre, previenen la apoptosis y senescencia, y contribuyen a la inmunosupresión (Thiery *et al.*, 2009). Se han descrito varios factores de

transcripción que actúan como inductores de la transición EMT, entre los que destacan factores de la familia Snail (Snail1 y 2) y de la familia bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) como Twist. Su regulación implica una amplia variedad de vías de señalización, como la de Notch (Zhang *et al.*, 2010) y la del TGF- $\beta$  (Drabsch *et al.*, 2012). Hay evidencias que sugieren que la expresión de Snail2 en osteosarcomas de huesos largos se correlaciona con la malignidad del tumor (Sharili *et al.*, 2011).

## 1.2 LA VITAMINA D Y SU RECEPTOR.

### 1.2.1 Aspectos generales de los receptores nucleares.

Los Receptores Nucleares (RN) son una familia de factores de transcripción que regulan la expresión génica dependiente de ligando (Carlberg *et al.*, 2010). Todos los ligandos de los RN son pequeños, lipofílicos, siendo posible su entrada a la célula a través de un mecanismo pasivo. En algunos casos se necesita una proteína transportadora de membrana. Los ligandos suelen ser hormonas clásicas como las esteroideas y tiroideas, las formas activas de las vitaminas A y D (liposolubles) y ciertos metabolitos. La denominada “superfamilia” de RN incluye también receptores “huérfanos”, sin ligando conocido. Juegan un papel fundamental en una gran variedad de procesos biológicos entre los que se incluyen el crecimiento, la diferenciación, el metabolismo, la reproducción y la morfogénesis de los organismos superiores, incluyendo los humanos. La mayoría de las acciones celulares de estas hormonas están mediadas por medio de unión directa a RN, que actúan como factores de transcripción dependientes de ligando, para activar o reprimir un gran número de genes diana (Aranda *et al.*, 2001). Los RN regulan la transcripción por unión a secuencias específicas de ADN conocidas como elementos de respuesta a hormona (HREs). Excepto algunos receptores huérfanos que se unen a los HREs como monómeros, el resto de los RN se unen al ADN en forma de dímeros; homodímeros en el caso de los receptores de esteroides y heterodímeros en el resto. En el caso de los receptores heterodiméricos, la pareja para todos ellos es el *Receptor X Retinoide* (RXR). Los efectos transcripcionales de los RN están mediados por el reclutamiento de coactivadores y corepresores (Gronemeyer *et al.*, 2004). A continuación nos centraremos en un RN concreto, el receptor de vitamina D (VDR).

### 1.2.2 El Receptor de la Vitamina D.

La vitamina D (VD) es una hormona esteroide importante que interviene en la homeostasis mineral y en la formación y mantenimiento de la estructura ósea (Haussler *et al.*, 1997). La actividad biológica de la VD requiere la mediación de su receptor VDR (*Vitamin D*

*Receptor*), miembro de la superfamilia de RN de las hormonas esteroideas/tiroideas (Dusso *et al.*, 2005).

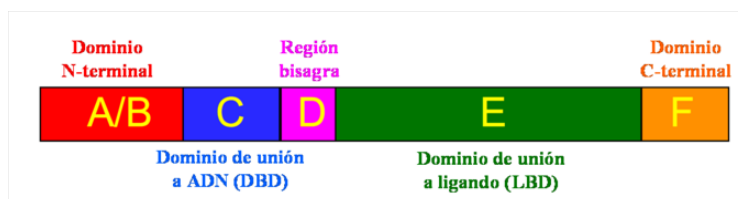
El VDR humano se localiza en el cromosoma 12. El gen está formado por al menos 14 exones y abarca aproximadamente 75 kb. 6 exones (1A a 1F) ocupan la región 5'-no codificante y 8 adicionales (2-9) codifican el componente estructural del VDR. La expresión de VDR es regulada tanto por niveles transcripcionales como por post-traduccionales. Como un RN que es, el VDR tiene cinco regiones bien definidas (denominadas de A a F) que pueden funcionar de forma autónoma (Esquema 3):

- A/B: Formada por el dominio regulador N-terminal variable. Contiene la función de activación 1 (AF-1).
- C: Dominio conservado de unión al ADN (DBD, del inglés *DNA Binding Domain*).
- D: Región bisagra. Conecta los dominios DBD y LBD.
- E: Dominio de unión a ligando (LBD, *Ligand Binding Domain*). Contiene la función de activación 2 (AF-2).
- F: Dominio C-terminal.

En la región N-terminal se localiza el DBD, una región altamente conservada entre los RN esteroideos y con dos motivos de dedos de zinc. El primer dedo de zinc es el responsable de que el VDR pueda unirse con secuencias específicas de DNA de la región promotora de los genes dependientes de VD. Dichas secuencias génicas son conocidas como elementos de respuesta a la VD (VDRE, *Vitamin D Response Elements*). El segundo dedo de zinc es el responsable de la heterodimerización del VDR con el RXR, un proceso indispensable para que el VDR tenga una alta afinidad por el DNA. Además necesita interactuar con proteínas nucleares correguladoras que permitan una modulación positiva o negativa de la transcripción en la que interviene el VDR.

En la región C-terminal se localiza el LBD, un dominio globular multifuncional, responsable de la unión de alta afinidad con la VD (u otras moléculas con una estructura capaz de mimetizarla). La estructura del LBD está formada por 12 $\alpha$ -hélices y la unión de un ligando produce unos cambios estructurales que dan lugar a la interacción con RXR, coactivadores y otras proteínas que intervienen en la transcripción formando un dominio de activación de la función (AF-2). Su activación requiere la unión de proteínas motoras (Racz *et*

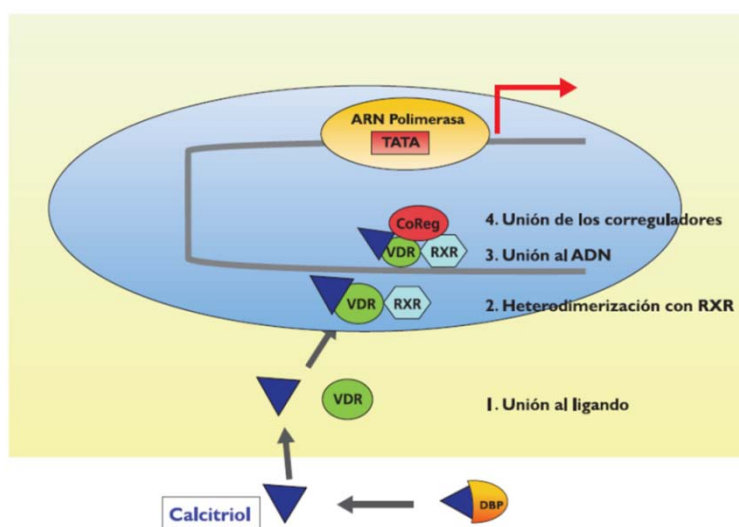
*al.*, 1999) que son las responsables de la rápida translocación del VDR desde el citoplasma al núcleo a través de microtúbulos (Barsony *et al.*, 1992).



**Esquema 3.** Dominios funcionales de los receptores nucleares.

### 1.2.3 Mecanismo de acción del VDR.

Los RN pueden presentar diferentes mecanismos de acción dependiendo de su localización subcelular en ausencia de ligando. En este caso concreto, la VD circula unida a la proteína ligadora DBP (*Vitamin D Binding Protein*), y al ingresar en las células diana, se une a su receptor. Una vez unida al VDR, se heterodimeriza con el RXR, y este complejo VDR/RXR se une a regiones promotoras específicas en los genes diana. Este complejo unido al ADN, atrae a proteínas coactivadoras que junto a la ARN polimerasa darán lugar a la transcripción de genes diana. Las respuestas a que pueden dar lugar ponen de manifiesto el papel relevante del sistema hormonal de la VD en múltiples sistemas. Están relacionadas con efectos anti-proliferativos, inductores de la diferenciación e inmunomoduladores (Dusso *et al.*, 2005), apoptosis (Sergeev 2004) y función muscular (Endo *et al.*, 2003) entre otros. En el Esquema 4 se puede observar el mecanismo de acción general del VDR.



**Esquema 4.** Mecanismo de acción del VDR.



#### **1.2.4 Acción de la VD en el esqueleto óseo.**

Está descrito que el VDR se distribuye en multitud de tipos celulares lo que justifica la gran variedad de acciones en el organismo, pero la célula diana del eje regulador VD-VDR es el osteoblasto, interviniendo en el desarrollo y el mantenimiento de la mineralización del esqueleto. Además, actúa en el enterocito y la nefrona, regulando los niveles sistémicos normales de calcio y fósforo (Wang Y *et al.*, 2012; Yamaguchi *et al.*, 2012). Como regulador de la transcripción de genes diana relacionados con el metabolismo óseo, la VD induce la expresión de osteocalcina (OC), osteopontina (OP), RANKL (*Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B Ligand*) e inhibe la de colágeno tipo I (Col I) y la de osteoprotegerina (OPG). Esto es debido a que puede regular la expresión de marcadores fenotípicos osteoblásticos tanto positiva como negativamente. La respuesta al tratamiento con VD es diferente dependiendo del estado de diferenciación de las células.

El sistema regulador VD-VDR ha sido estudiado en el proceso de osificación endocondral que tiene lugar en los huesos largos y en las vértebras. Recientemente, trabajos sobre la osteocalcina ponen de manifiesto la importancia del sistema regulador VD-VDR al formar parte, junto a Runx2, del transcriptoma que regula la expresión de OC (Karsenty *et al.*, 2012).

#### **1.2.5 Acción de las hormonas Prolactina y Estrógenos en el esqueleto óseo.**

La prolactina (P) es una hormona que fue considerada durante mucho tiempo de origen exclusivamente hipofisario, y cuya función más importante era la promoción de la lactancia. Sin embargo, la P no sólo se sintetiza en diversos sitios del organismo (Mancini *et al.*, 2008), sino que también participa en una amplia variedad de procesos biológicos. La P no posee un órgano blanco específico pero sí una heterogeneidad funcional, cuyos mecanismos de acción endocrinos, paracrinós y autocrinos, le permiten comportarse como hormona, como factor de crecimiento, como neurotransmisor y como inmunomodulador. Sin embargo, las acciones más destacadas son la de regular el desarrollo de la glándula mamaria, próstata, fertilidad y el esqueleto óseo (Ogueta *et al.*, 2002). Nuestro grupo demostró que la P es un componente del líquido sinovial humano y determinó la expresión de su receptor en los tejidos de la articulación de la rodilla (Ogueta *et al.*, 2002). En trabajos consecutivos se puso de manifiesto que las hMSCs expresan el sistema regulador Prolactina-Receptor de Prolactina (P-PR) junto a genes del desarrollo y los marcadores óseos correspondientes (Romero-Prado *et al.*, 2006). La P en estas células contribuye tanto a la proliferación como a la diferenciación osteocondroblástica mediada por la señalización intracelular de la ruta Jak-STAT (M<sup>a</sup> Jesús

Delgado, Tesis Doctoral, 2010). La importancia de la P en el hueso también ha sido demostrada con el uso de animales KO para el PR. Los ratones KO del receptor presentaban alteraciones óseas y retraso en la calvaria (Ormandy *et al.*, 1997). Todos estos datos atribuyen a la P una función prioritaria en la biología del esqueleto de los vertebrados.

Por otro lado, los estrógenos (E) pertenecen a la familia de hormonas esteroideas las cuales ejercen una gran variedad de efectos sobre el crecimiento, desarrollo y diferenciación de diferentes tejidos. La acción reguladora primaria de los E está restringida principalmente a los órganos reproductivos; sin embargo, pueden regular otros procesos en tejidos como hueso, músculo, hígado, sistema cardiovascular y cerebro (Katzenellenbogen *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2012). Uno de los más importantes efectos es el que ejerce sobre el metabolismo del hueso, ya que mantienen la consistencia del esqueleto, impidiendo la salida de calcio del hueso durante la edad reproductiva de la mujer. Los E contrarrestan la acción de otras hormonas, como la hormona PTH, que promueve la llamada resorción ósea. Los E contribuyen a que haya un equilibrio entre la formación y la destrucción del hueso, a través de su actuación en los receptores que se encuentran en las células óseas, por lo tanto al mantenimiento de la masa ósea. Su deficiencia genera pérdida ósea, osteoporosis y fracturas. Hasta finales de la década de los 80, se creía que los E actuaban indirectamente sobre el hueso a través de la regulación de la secreción de hormonas calciotrópicas. Hoy está demostrado que todas las células óseas (osteoblastos, osteoclastos y osteocitos) contienen receptores funcionales para estrógenos (ER, *Estrogen Receptor*), aunque en menor concentración que en los tejidos reproductivos. Existen dos tipos de ER,  $\alpha$  y  $\beta$ . Estos pertenecen a la familia de RN, los cuales son factores de transcripción que regulan la expresión génica de manera dependiente de su unión a ligando y en respuesta específica a señales fisiológicas y patológicas, y se encuentran distribuidos de manera diferencial: los ER $\alpha$  se encuentran principalmente en hueso cortical y los ER $\beta$  en el trabecular (Bord *et al.*, 2001). De cualquier manera, son los ER $\alpha$  quienes median la mayoría de las acciones óseas.

### 1.3 BIOMATERIALES UTILIZADOS EN INGENIERÍA DE TEJIDOS. MICRO-NANOTECNOLOGÍAS Y NANOMEDICINA.

La búsqueda y desarrollo de nuevos materiales capaces de sustituir al hueso es una de las prioridades en el tratamiento de defectos óseos de diferente etiología. Un ejemplo destacado son las fracturas óseas debidas a enfermedades degenerativas como la osteoporosis, que son cada vez mas frecuentes dado el aumento de la esperanza de vida en los países desarrollados. Por eso, en los últimos años se están desarrollando progresivamente (Stevens MM 2008) nuevos materiales y procesos que permiten mejorar gradualmente las distintas terapias.

La Nanomedicina comprende aquellas prácticas médicas, incluyendo la prevención, el diagnóstico y la terapia, que requieren tecnologías basadas en interacciones entre el cuerpo humano y materiales, estructuras o dispositivos cuyas propiedades se definen a escala nanométrica. La interacción entre los componentes del cuerpo humano y los materiales creados mediante herramientas micro y nanotecnológicas abre las puertas a nuevas herramientas para la medicina (Arora *et al.*, 2012). Los avances producidos por la entrada de la Nanotecnología se concretan principalmente en: mejoras en los métodos de diagnóstico, en la liberación de fármacos, en tratamientos paliativos/destructivos localizados (cáncer) y en la medicina regenerativa. En este trabajo, nos centraremos principalmente en la Medicina Regenerativa que es una disciplina que busca el mantenimiento, la mejora o la restauración de la función de las células, tejidos y órganos, mediante la aplicación de métodos relacionados principalmente con la Terapia Celular y la Ingeniería Tisular.

La convergencia entre la Nanotecnología y la Ingeniería de tejidos se produce en el momento en el que se identifica que un conjunto de células en contacto con un soporte sintético, biodegradable y poroso, puede formar *in vivo* tejidos vascularizados con una masa celular considerable (Vacanti *et al.*, 1988). En 1993 Langer y Vacanti publicaron el enfoque más común hacia el desarrollo de sustitutos biológicos. Éste está basado en tres componentes principales: las células, las moléculas bioactivas (factores tróficos) y los materiales tri-dimensionales (andamios, del inglés “*scaffolds*”). Las células son las encargadas de sintetizar la matriz extracelular del tejido nuevo y restaurar la función de los tejidos dañados, el andamio debe proporcionar un ambiente favorable para la adhesión, proliferación y diferenciación celular y los factores tróficos deben facilitar y promover la regeneración del nuevo tejido. Durante la última década, numerosos investigadores han observado una respuesta sinérgica cuando estos tres componentes se han utilizado juntos para propósitos de ingeniería de tejidos (Bran *et al.*, 2008; Janicki *et al.*, 2011).

### 1.3.1 Células madre, MSCs.

Un punto clave en la Ingeniería de Tejidos es la existencia de células progenitoras que, depositadas sobre los soportes y en presencia de moléculas de señalización, pueden dar lugar a tejidos completos (Kuroda *et al.*, 2011). A grandes rasgos, las líneas actuales de investigación están encaminadas al uso de células madre adultas como fuente de células que son depositadas sobre un soporte constituido por materiales porosos que permiten la difusión de líquidos y facilitan la vascularización rápida del nuevo tejido formado.

### **1.3.2 Factores tróficos.**

Las estrategias que utiliza la bioingeniería para crear nuevos tejidos y órganos se fundamentan en combinar materiales artificiales con moléculas bioactivas que inducen la formación tisular (Freyria *et al.*, 2012). En 2008 Caplan propuso que las MSCs son secretoras de grandes cantidades de moléculas bioactivas que contribuyen a las funciones inmunomoduladoras mediante la estructuración de un ambiente regenerativo. Las moléculas bioactivas de señalización son aquellas moléculas que se encuentran de forma natural en las células y provocan eventos regenerativos en éstas. A esta clase de moléculas pertenecen los factores de crecimiento, citoquinas, receptores y segundos mensajeros.

En el proceso de formación de un tejido es necesario que los distintos eventos que tienen lugar se produzcan de una forma ordenada y secuencial, de ahí que el desarrollo de tecnologías que permitan la liberación progresiva de estas moléculas de señalización sea un factor crítico para la Ingeniería de tejidos. Esto se ha conseguido gracias a la Nanotecnología, mediante el diseño de biomateriales que incorporen moléculas de señalización que, una vez insertadas en el paciente, sean liberadas de forma gradual y activen la regeneración tisular *in vivo*. Conviene destacar el uso de factores de crecimiento para aplicaciones regenerativas en ortopedia (Kanitkar *et al.*, 2011).

### **1.3.3 Biomateriales.**

El principio más importante en que se basa la ingeniería de tejidos implica la combinación de células vivas con un soporte natural o sintético (andamiaje), para producir un tejido vivo que es funcional, estructural y mecánicamente igual, si no mejor, que el tejido al que reemplaza (Stock *et al.*, 2001; Vats *et al.*, 2004; Janicki *et al.*, 2011). Durante el proceso de reparación, el *scaffold* no solo proporciona una estructura tridimensional temporal sino que también controla la liberación de los factores tróficos. Un *scaffold* que permite llevar a cabo esa variedad de funciones en la ingeniería de tejidos debe cumplir una serie de requerimientos, entre los que destacan:

- Ser biocompatible con los tejidos, es decir, no debe ser mutagénico, ni carcinogénico, ni antigénico.
- Tener una biodegradabilidad controlada con el fin de que el tejido sustituya eventualmente al *scaffold*.
- Ser quirúrgicamente manejable.

- Poseer unas propiedades mecánicas adecuadas según el tipo de aplicación y en particular las relativas a la mecánica de fluidos.
- Debe poseer una porosidad y una morfología apropiada para favorecer el transporte de células, gases, metabolitos, nutrientes y factores tróficos tanto dentro del andamio como entre éste y el medio circundante.
- Debe promover la viabilidad celular, diferenciación y producción de matriz.
- Debe proporcionar integridad mecánica.

En este sentido, un gran número de materiales orgánicos, inorgánicos e híbridos han sido propuestos para participar en procesos regenerativos de distintos tejidos y órganos. Entre ellos destacan sin duda los polímeros biodegradables, tanto de origen natural como sintético, que han sido estudiados en profundidad para el desarrollo de *scaffolds* aplicados en la ingeniería de tejidos (Kessler *et al.*, 2008). Entre los polímeros sintéticos, los poliésteres tales como la policaprolactona (PCL) (Williams *et al.*, 2005; Jeong *et al.*, 2012) y el ácido poliláctico (PLA) (Charles-Harris *et al.*, 2008; Yanoso-Scholl *et al.*, 2010) han recibido una atención especial. Son utilizados en forma pura o en copolimerización con el polietilenglicol (PEG) (Ni *et al.*, 2011). Dentro de los polímeros naturales, conviene destacar la agarosa (Sheehy *et al.*, 2011), la gelatina (Azami *et al.*, 2012) y el quitosano (Abarrategi *et al.*, 2010).

Otra forma de afrontar la regeneración del tejido es la denominada regeneración de tejidos *in situ*. Para llevarla a cabo, los biomateriales se presentan en forma de disoluciones, polvo o micropartículas. En numerosos casos se usan materiales inorgánicos que ejercen por tanto funciones mas allá del tradicional soporte mineral. Estos materiales bioactivos liberan compuestos tales como factores de crecimiento u otras moléculas activas que estimulan la reparación local del tejido.

La aplicación de procesos micro y nanotecnológicos ha permitido simultáneamente analizar el comportamiento celular en nuevas configuraciones que mimeticen patrones celulares mediante el control n-dimensional. Aunque en la actualidad nos encontramos en un grado de infra-aplicación a sistemas terapéuticos reales, si está extendido el uso *in vitro* de soportes con diseños lineares (1D) y reticulares (2D, 3D) de alto valor fundamental.



## ***2. Objetivos***





Las células mesenquimales pluripotenciales (MSCs) son las responsables de la formación endocondral de los huesos y de los procesos de regeneración ósea siendo las células idóneas para el estudio de ambos procesos. Estas células aisladas de la médula ósea han sido utilizadas para estudiar:

1. La acción celular y molecular de la Vitamina D en los procesos de proliferación y diferenciación osteocondral.
2. La posible relación antagónica con los estrógenos y otros factores específicos de hueso.

Por otro lado, la ingeniería tisular combina las células y los biomateriales para proporcionar sustitutos artificiales vinculados a la reparación y a las técnicas de reemplazo. Por ello vamos a:

3. Evaluar las hMSCs sobre diferentes superficies de biomateriales con modificaciones químicas y/o topográficas. Analizar los cambios morfológicos de las células y su proliferación.
4. De forma recíproca, se pretende aportar parámetros biológicos que permitan identificar la bondad/adaptación de biomateriales de distinta naturaleza (orgánicos, inorgánicos e híbridos) y estructura (andamio, partícula).



### ***3. Materiales y Métodos***



### **3.1 TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR.**

#### **3.1.1 Células mesenquimales humanas.**

Las células pluripotentes mesenquimales humanas (hMSCs) se obtuvieron a partir de dos ó tres mililitros de aspirados de la cresta ilíaca de donantes sanos proporcionadas por el Dr. Rañada del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de la Princesa (Servicio de Salud de la Seguridad Social, Madrid, España). Las células se aislaron por centrifugación en gradiente de Percoll al 70% (según el protocolo del Dr. Arnold I. Caplan (Lennon *et al.*, 1996), con algunas modificaciones (Ogueta *et al.*, 2002)). Las células se cultivaron en un medio *Eagle modificado por Dulbecco* (DMEM) de baja glucosa (1 g/L) (DMEM-LG) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Hyclone y Sigma) testado y seleccionado para hMSCs, 2 mM de glutamina, 0,01% de estreptomicina y 0,06% de penicilina G (**Medio de Crecimiento, MC**) y los cultivos se mantuvieron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y con un 97% de humedad relativa. El medio se cambió dos veces por semana.

Las hMSCs fueron mantenidas hasta obtener una confluencia del 80% y los pases de células fueron realizados por tripsinización (0,25% Tripsina y 0,02% EDTA, preparado en el Servicio de Cultivos del CBMSO). El tratamiento se realizó durante 5 minutos y la tripsina se neutralizó con FBS. Las células fueron contadas con la cámara de Neubauer y sembradas a  $2 \times 10^5$  en placas de cultivo p100. Las hMSCs fueron utilizadas y algunas alícuotas congeladas después del cuarto pase. La congelación se realizó utilizando  $1 \times 10^6$  hMSCs en un mililitro de FBS:DMSO (9:1) congeladas progresivamente a -70°C y posteriormente en N<sub>2</sub> líquido.

#### **3.1.2 Tratamiento de las placas de cultivo celular con gelatina.**

Los ensayos de adhesión, proliferación y diferenciación osteocondral de las células hMSCs se realizaron sembrando (el número de células que se indica en *Resultados*) en cubres cubiertos por gelatina al 0,5% (Skin Bovine, Sigma) en buffer fosfato salino (PBS) y dispuestos en placas M24 (Falcon). El tratamiento de los cubres con gelatina duró como mínimo una hora a 37°C y finalizado el tiempo se lavaron dos veces con PBS para eliminar posibles restos y rápidamente se sembraron las células con el medio de cultivo adecuado para evitar que se secase la gelatina y que disminuyeran sus propiedades de adherencia celular.

### **3.1.3 Ensayos de proliferación.**

La proliferación celular ha sido estimada por la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina al DNA de hMSCs y por determinación de Ki67 mediante inmunocitoquímica.

#### **3.1.3.1 Incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina.**

1,5 x 10<sup>4</sup> células fueron sembradas en placas de cultivo M24 y se cultivaron con medio de crecimiento durante 24 horas. Posteriormente, las células fueron ayunadas de FBS y expuestas a los diferentes tratamientos con hormonas: Vitamina D (VD, diferentes concentraciones nM (Sigma)), Estrógenos (E, 40 nM (Sigma)), Prolactina (P, 40 ng/ml (R&D System)) e Insulina, Transferrina y Selenio (ITS, a 6,25 µg/ml cada uno) durante 72 horas y las últimas 16 expuestas con 1 µCi/ml de [<sup>3</sup>H]-timidina (Ogueta *et al.*, 2002). La acción de la VD sobre la proliferación se estudió mediante una curva de concentración respecto a [<sup>3</sup>H]-timidina durante 72 horas y después comparando este mismo efecto en presencia de otras hormonas como P y E. Transcurrido el tiempo, se retiró el medio radiactivo y las hMSCs fueron lavadas con PBS. Las células fueron lisadas mediante dos ciclos de congelación/descongelación y el DNA fue recuperado con la ayuda de un colector de células automático donde quedó retenido y fijado en papel de filtro Whatman 3MM. Los filtros fueron lavados dos veces con PBS y secados con etanol al 95%. Una vez secos, se colocaron en viales con líquido de centelleo (Optiphase "Hi-phase 2", Wallac) y la radiactividad se midió utilizando un programa <sup>3</sup>H en un contador de centelleo líquido Rack Beta (LKB Wallac). Las determinaciones se realizaron por triplicado y como control positivo se utilizó DMEM-LG con 10% de FBS. Los resultados de proliferación son la media de tres experimentos independientes y se han expresado en cuentas por minuto (c.p.m.) de ([<sup>3</sup>H]-timidina) incorporadas al DNA.

#### **3.1.3.2 Determinación de Ki67 mediante inmunocitoquímica.**

La proliferación celular también se estudió valorando la presencia de Ki67 en el núcleo que se expresa en células en proliferación, es decir, en todas las fases del ciclo celular excepto en Go utilizando un anticuerpo monoclonal de conejo, anti-Ki67. Con esta finalidad se sembraron 1,5 x 10<sup>4</sup> células en cubres pretratados con gelatina y se cultivaron en MC durante 24 horas. Posteriormente, las células fueron ayunadas de FBS y expuestas durante 72 horas a las diferentes hormonas: 1 y 10 nM VD, 40 nM E y 40 ng/ml P como se indica en *Resultados*. Transcurrido el tiempo, se retiró el medio y se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído (PFA) (Merck) al 3,7% en PBS durante 20-30 minutos a temperatura ambiente (RT), se hicieron dos lavados más y se mantuvieron a 4°C hasta realizar la

inmunocitoquímica. Los resultados son la media de tres experimentos independientes y se han expresado en porcentaje de expresión respecto al control.

### **3.1.4 Ensayos de diferenciación osteocondral.**

Resultados anteriores de nuestro grupo mostraron la plasticidad de las hMSCs en respuesta a diferentes estímulos y nos pareció interesante estudiar las bases celulares de la VD en ellas. Los ensayos de diferenciación osteocondral se realizaron según la metodología descrita en anteriores trabajos (Pittinger *et al.*, 1999; Romero-Prado 2006; Ogueta *et al.*, 2002). Las células fueron sembradas en MC a una densidad del 80% de confluencia, es decir,  $1 \times 10^6$  células/placa p100, para llevar a cabo la extracción de RNA y realizar determinaciones de expresión génica mediante RT-PCR y  $1,5 \times 10^4$  células/placa M24 fueron sembradas en cubres tapizados con gelatina al 0,5% para llevar a cabo análisis por inmunocitoquímica. Después de 24 horas, las células fueron lavadas dos veces con PBS y expuestas al **Medio de Diferenciación osteocondral** compuesto de DMEM-LG suplementado con ITS+™ Premix (6,25 µg/ml insulina, 6,25 µg/ml transferrina, 6,25 ng/ml ácido selenioso, 1,25 mg/ml albúmina, 5,35 µg/ml ácido linoleico (BD Biosciences)), 2 mM glutamina, 1 mM piruvato (Gibco), 400 µM aminoácidos no esenciales, 40 µg/ml ácido ascórbico (WAKO), 0,01% de estreptomycin y 0,06% de penicilina G. A este medio se añadieron diferentes hormonas por su posible efecto en la diferenciación osteocondral a las concentraciones siguientes: 40 ng/ml P, 40 nM E y 1 nM VD. Los ensayos de diferenciación osteocondral se mantuvieron entre siete y catorce días con dos cambios de medio por semana. Transcurrido el tiempo, se retiró el medio, se lavaron las células dos veces con PBS y se fijaron o se destinaron a la extracción de RNA. Las que fueron fijadas, se guardaron a 4°C hasta realizar la inmunocitoquímica.

### **3.1.5 Ensayos de diferenciación condrogénica.**

Para llevar a cabo los ensayos de diferenciación condrogénica, crecimos las células a una densidad del 80% de confluencia. Lavamos las células dos veces con PBS y procedimos a levantarlas de las placas de cultivo. Después sembramos  $2 \times 10^5$  células en Falcon de 15 ml en presencia de medio de diferenciación condrogénico para poder formar los “pellets” o condrocitos. Dicho **Medio condrogénico** consta de: DMEM-LG suplementado con ITS+™ Premix (6,25 µg/ml insulina, 6,25 µg/ml transferrina, 6,25 ng/ml ácido selenioso, 1,25 mg/ml albúmina, 5,35 µg/ml ácido linoleico (BD Biosciences)), 1 mM piruvato, 40 µg/ml ácido ascórbico, 0,01% de estreptomycin, 0,06% de penicilina G y en presencia de Dexametasona (Dex, 0,1 µM (Sigma)) ó TGF-β1 (0,06 ng/ml (R&D System)) y mezcla de ambos. Las células se diferenciaron durante catorce días como mínimo y con dos cambios de medio por semana.

Transcurrido el tiempo, se fijaron los condrocitos con PFA y se guardaron a 4°C hasta realizar la inmunocitoquímica.

### **3.1.6 Ensayos de citotoxicidad.**

La posible citotoxicidad de los factores/productos usados en la experimentación con el cultivo de hMSCs se precisó usando el método colorimétrico del formazán. En el caso de la VD se determinó tras 72 horas de cultivo en DMEM-LG con concentraciones crecientes de VD (1, 10, 100 nM y 1, 10 µM), evaluando la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico MTT (Sigma). Este ensayo se basa en la capacidad de las células viables de convertir una sal de tetrazolio, el MTT [*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylterazolum bromide*], en un producto final azul, el formazán, por acción de las deshidrogenasas mitocondriales. Para ello se añadieron 20 µl de un stock de MTT (5 mg/ml MTT en PBS) a cada pocillo de una placa M96 (volumen final de 100 µl) en la que se encontraban células con los distintos tratamientos. Tras 4 horas de incubación se retiró el medio y se añadieron 150 µl de 4 mM HCl con 0,1% de Nonidet P-40 (NP-40) en isopropanol (Merck). Después de aproximadamente 15 minutos la absorbancia de cada muestra se determinó en un espectrofotómetro (SmartSpec™ Plus BIO-RAD) a 590 nm y utilizando un filtro de referencia de 620 nm. Cada concentración se analizó por triplicado y los resultados se expresan como la media ± desviación estándar.

Este mismo ensayo se realizó en presencia de partículas de Silicio Poroso infiltradas con Cobalto y de éstas mismas conjugadas con polietilenglicol (PEG) en el cultivo de hMSCs después de 4 y 72 horas de incubación. Para ello, se partió de una alícuota de 300 µl de partículas (concentración 25 g/L), se centrifugó 10 minutos a toda velocidad en la microcentrífuga, se retiró el sobrenadante, se lavó con PBS y se volvió a centrifugar. Se resuspendieron en medio de cultivo y a continuación se sembraron sobre las células ya adheridas, y mantuvimos durante 48 y 72 horas.

## **3.2 INMUNOCITOQUÍMICA Y MICROSCOPIAS.**

### **3.2.1 Inmunocitoquímica y microscopía de fluorescencia.**

En placas M24, en las que previamente se habían depositado cubres pretratados con gelatina, se sembraron  $1,5 \times 10^4$  células por pocillo en presencia de MC. Al día siguiente se lavaron 2 veces con PBS y se cultivaron con los tratamientos y durante los tiempos indicados en los *Resultados*. Transcurrido el tiempo, se fijaron con PFA al 3,7% en PBS durante 30



minutos a RT, se lavaron nuevamente con PBS y se trataron con 50 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pH 8 durante 10 minutos para eliminar la autofluorescencia. Las células fueron permeabilizadas con 0,5% de Triton X-100 (Sigma) en un tampón compuesto de 100 mM NaCl, 10 mM Pipes pH 6.8, 0,3 mM de sacarosa, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM EGTA y  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ (Buffer C) y se procesaron siguiendo el método descrito anteriormente (Javed *et al.*, 2000) con algunas modificaciones (Romero-Prado *et al.*, 2006). Para eliminar las posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos se bloquearon las preparaciones con solución de bloqueo 1% PBSA (1% de BSA en PBS) durante una hora. Posteriormente se lavaron un par de veces con 0,1% de PBSA y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante una hora también en presencia de 0,1% de PBSA. A continuación, las preparaciones se lavaron con este mismo buffer y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 45 minutos en oscuridad. Se realizaron dos lavados finales con 0,1% de PBSA, uno con PBS y otro con agua MilliQ. Para terminar la inmunocitoquímica se deshidrataron las muestras con etanol absoluto (Merck), se dejaron secar y se montaron con Mowiol/Dabco (Calbiochem). La visualización de las muestras se llevó a cabo en un Microscopio invertido IX81 Olympus con una cámara digital DP72.

Los anticuerpos específicos primarios y secundarios que han sido utilizados en los diferentes ensayos fueron los siguientes:

Anticuerpos primarios	Diluciones usadas	Casa comercial
Suero ratones transgénicos	1:100	---
Faloidina Alexa 488	1:100	Invitrogen
$\beta$ -Tubulina	1:2000	Sigma
Vimentina	1:2	Abcam
$\beta$ -catenina	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Talina	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Ki67	1:200	NeoMarkers
STAT1	1:100	NeoMarkers
STAT3	1:200	Santa Cruz Biotechnology
STAT5	1:2000	Santa Cruz Biotechnology
ER	1:200	NeoMarkers
VDR (D-6)	1:200	Santa Cruz Biotechnology
VDR (C-20)	1:200	Santa Cruz Biotechnology
RUNX2 (M-70)	1:200	Santa Cruz Biotechnology

RUNX2 (C-19)	1:200	Santa Cruz Biotechnology
RXR $\alpha$	1:200	Santa Cruz Biotechnology
GR	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Sox-9	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Colágeno II	1:200	Invitrogen
DAPI	1:5000	Calbiochem
VEGF	1:200	Santa Cruz Biotechnology
c/EBP $\alpha$	1:2000	Santa Cruz Biotechnology
c/EBP $\beta$	1:2000	Santa Cruz Biotechnology

Anticuerpos secundarios	Diluciones usadas	Casa comercial
Alexa 488 (de burro frente a conejo)	1:500	Invitrogen
Alexa 488 (de burro frente a ratón)	1:500	Invitrogen
Alexa 555 (de burro frente a conejo)	1:500	Invitrogen
Alexa 555 (de burro frente a ratón)	1:500	Invitrogen
Alexa 594 (de cabra frente a conejo)	1:500	Invitrogen

### **3.2.2 Análisis de los complejos de diferenciación ósea en los speckles nucleares mediante microscopía confocal.**

Para llevar a cabo la obtención de speckles, procedimos a realizar el ensayo de la misma manera que para la inmunocitoquímica. Después de una semana de diferenciación, las células dispuestas en cubres cubiertos de gelatina se lavaron con PBS frío durante 5 minutos y se fijaron con PFA al 3,7% durante 30 minutos. Se volvieron a lavar y se permeabilizaron en presencia de 0,1% Triton X-100 en PBS durante 10 minutos a RT. Después se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS y se siguieron una serie de tratamientos en donde se fueron retirando las diferentes proteínas para obtener finalmente los núcleos limpios. Brevemente se realizaron los siguientes pasos: 1) Eliminar las proteínas citosólicas, incubar durante 10 minutos en buffer CSK-0,5% Triton X-100 (10 mM PIPES pH 6.8, 100 mM NaCl, 300 mM sacarosa, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA y H<sub>2</sub>O MilliQ). 2) Eliminar proteínas del citoesqueleto, usar el buffer RBS (1% NP-40 y 0.5% Deoxicolato en Buffer CSK). 3) Eliminar los filamentos intermedios tratando con 0,3 mM Imidazol en H<sub>2</sub>O MilliQ

durante 2 minutos. 4) Eliminar el DNA usando 600 Unidades/ml DNasa I libre de RNasa (Roche) en buffer CSK durante 30 minutos a RT. Lavar varias veces con CSK. 5) Fijar las proteínas asociadas a los filamentos nucleares con 0,25 M  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  en CSK durante 5 minutos y quitar las proteínas asociadas inespecíficamente aumentando la fuerza iónica de CSK a 1 M NaCl durante 5 minutos a RT. 6) Por último se fijaron los complejos nucleares con PFA al 10% durante 15 minutos a RT y se hicieron 3 lavados con PBS durante 5 minutos. A partir de aquí, se siguió el protocolo de inmunocitoquímica como se ha descrito previamente. Una vez realizado el montaje y las muestras se encontraban totalmente secas, se visualizaron en un Microscopio Confocal Espectral Leica TCS SP5 del Servicio de Microscopía SIdI de la Facultad de Medicina de la UAM.

### **3.3 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.**

#### **3.3.1 Extracción de RNA total.**

La extracción del RNA de las hMSCs se realizó por el método clásico del fenol (lynedjian y Hanson, 1977) con modificaciones (Zabala y García-Ruiz, 1989) y para ello utilizamos  $1 \times 10^6$  células/p100 (2p100/tratamiento). El RNA de la fase acuosa fue liberado del DNA presente mediante incubación con 2 M LiCl y centrifugación. El RNA fue disuelto en TE (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA pH 8). Todo el material y el agua utilizada fueron esterilizados.

#### **3.3.2 Tratamiento con la DNasa libre de RNasa.**

Para asegurarnos de que el RNA estaba suficientemente limpio de restos de DNA, éste fue tratado durante 30 minutos a 37°C con 35 unidades de DNasa I libre de RNasa (Roche), 1 M de acetato sódico, 0,1 M de sulfato de magnesio y  $\text{H}_2\text{O}$  en un sistema de 60  $\mu\text{l}$  de reacción, realizándose una segunda purificación del RNA con un volumen de fenol equilibrado. El RNA fue precipitado de la fase acuosa después de ajustar a 0,5 M de NaCl con 2 volúmenes de etanol absoluto frío y fue resuspendido en 20  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC al 0,1%.

#### **3.3.3 Medida de la concentración de RNA final.**

La cantidad de RNA fue estimada mediante la densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro del tipo SmartSpec™ Plus BIO-RAD y la estimación universalmente aceptada de que una unidad de  $\text{OD}_{260}/\text{ml}$  equivale a la absorbancia de 40  $\mu\text{g}$  de RNA. La relación entre la absorbancia obtenida a las longitudes de onda de 260 y 280 nm

resultó ser siempre en torno a 2 lo que nos indicó el buen estado del RNA aislado de las células.

### 3.3.4 Diseño de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos específicos utilizados fueron seleccionados mediante el programa *Amplify* y se solicitaron a la empresa Sigma. Para el diseño de los oligos se siguieron unas pautas: a) El tamaño del oligo fue como mínimo de 20 pares de bases. b) La composición de G+C de cada oligo no supone más del 60% de las bases totales. c) Se comprobaron posibles hibridaciones entre los oligos (dímeros, intracebador (horquillas) y también con otros DNA complementarios) ya que disminuyen la eficiencia de la reacción y generan artefactos de amplificación. d) El tamaño del producto amplificado varía entre 100-800 pares de bases aproximadamente. Los oligonucleótidos se enviaron liofilizados y fueron resuspendidos en tampón TE.

Los oligos utilizados se muestran en la siguiente tabla:

Gen	Nº acceso	Secuencia 5'→ 3'	Longitud fragmento (pb)	Tm (°C)	Nº ciclos
<b>β-actina</b>	NM_001101	<b>S</b> GCATGGAGTCCTGTGGCATCCACG <b>A</b> GGGTGTAAACGCAACTAAGTCATAG	354	60	30
<b>VDR</b>	NM_000376	<b>S</b> AGCATGAAGCGGAAGGCACTAT <b>A</b> TCCTCTGCACTTCCTCATCTGT	157	65	40
<b>Runx2</b>	NM_004348	<b>S</b> TCGCTAACTTGTGGCTGTTG <b>A</b> TGGGGAGGTTTGTGAAGAC	606	63	40
<b>OC</b>	NM_000711	<b>S</b> AGCAGGGTGCAGCCTTTGT <b>A</b> ACAGGTAGCGCCTGGGTCT	70	54	35
<b>OP</b>	NM_000582	<b>S</b> CTAGGCATCACCTGTGCCATACC <b>A</b> CTTGTGGCTGTGGGTTTCAGC	653	59	35
<b>COL I A1</b>	NM_000088	<b>S</b> AATCACCTGCGTACAGAACGG <b>A</b> CCTCCGGTTGATTTCTCATCA	413	53	38
<b>COL X A1</b>	NM_000493	<b>S</b> CTCTTGTTAGTGCCAACCAGG <b>A</b> GGTTTGTTGGTCTGATAGCTC	583	53	38
<b>Col II</b>	NM_001844	<b>S</b> GGTGAGAACGGATCTCCG <b>A</b> ACCTGGTTTTCCACCTTCACC	382	48	40

<b>SOX9</b>	NM_000346	<b>S</b> CGATCTGAAGAAGGAGAGCGA <b>A</b> CGTTCTTCACCGACTTCTCTCC	382	54	40
<b>VEGF</b>	NM_001025366	<b>S</b> CCATGAAC TTTCTGCTGTCTTGG <b>A</b> CTCACCGCCTCGGCTTGTACAC	342	55	40
<b>TGF- <math>\beta</math>3</b>	NM_003239	<b>S</b> GATGGAAATCAAATTCAAAGG <b>A</b> CATCCCTTTCTCTATCCCC	794	50	35
<b>Smo</b>	NM_005631	<b>S</b> CAGGACATGCACAGCTACATCG <b>A</b> CCACAAAGAAGCACGCATTGAC	147	53	35
<b>Aromatasa</b>	NM_000103	<b>S</b> CTGGAAGAATGTATGGACTT <b>A</b> GATCATTCCAGCATGTTTT	660	55	40
<b>ER<math>\alpha</math></b>	NM_001122742	<b>S</b> GAAGTGGGAATGATGAAAGGTG <b>A</b> GCCAGACGAGACCAATCATCAG	543	64	40
<b>PRL</b>	NM_000948.3	<b>S</b> CATCAACAGCTGCCACACTT <b>A</b> AATGGATGTGGGCTTAGCAG	452	62	40
<b>c/EBP<math>\alpha</math></b>	NM_004364	<b>S</b> CACCTGCAGTTCCAGATCG <b>A</b> GTACTCGTTGCTGTTCTTGTCCAC	243	64	40
<b>IL6</b>	NM_00600	<b>S</b> GAGAAAGGAGACATGTAACAAGAGT <b>A</b> GCGCAGAATGAGATGAGTTGT	388	60	40

### 3.3.5 RT-PCR.

La síntesis del DNA complementario se realizó mediante la reacción de retrotranscripción y se llevó a cabo en un volumen de 20  $\mu$ l de una solución que contenía 50 mM Tris- HCl pH 8.3, 75 mM KCl y 15 mM MgCl<sub>2</sub>, utilizando 2,5  $\mu$ g de RNA total con 500 nM de dNTP, 250 ng/ml de cebador (Invitrogen), 10 mM DTT y 200 unidades de retrotranscriptasa (Invitrogen). Las condiciones de la reacción fueron ajustadas a 5 minutos a 65°C iniciales, 52 minutos a 42°C de polimerización y 15 minutos a 70°C para finalizar la polimerasa. La reacción de PCR se realizó utilizando 1  $\mu$ l de la reacción de retrotranscripción junto con 6,25 picomoles de cada oligonucleótido (sentido y antisentido), 200  $\mu$ M de dNTPs y 0,5 unidades de la DNA polimerasa (Biotools), en una solución compuesta por 75 mM Tris HCl pH 9.0, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 5% de DMSO, en un volumen final de 25  $\mu$ l. Las condiciones generales de las reacciones fueron: 5 minutos de desnaturalización previa a 94°C, seguida de 30-40 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de anillamiento a la temperatura específica de cada pareja de oligonucleótidos y 1 minuto de elongación a 72°C. Se continuó la reacción dejando un ciclo de 10 minutos a 72°C para que terminaran de elongar todos los fragmentos y después acaba disminuyendo la temperatura a 4°C.

### **3.3.6 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes.**

Los productos de la reacción se determinaron por medio de una electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Para ello se preparó un gel de agarosa al 1,5% en tampón TBE (18 mM Tris borato y 0,4 mM EDTA) y se permitió que las muestras migraran aplicando una corriente de 70 V. Para la visualización del gel se intercaló el Bromuro de Etidio (BrEt) en el DNA y se fotografió en presencia de la irradiación de luz ultravioleta (UV). Todas las reacciones incluyeron un control negativo sin muestra procedente de la RT-PCR pero sí con la mezcla madre que llevaba el resto de reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción de PCR.

## **3.4 TINCIONES CELULARES.**

### **3.4.1 Fosfatasa alcalina.**

La detección de fosfatasa alcalina (ALP) del citosol de las MSCs en presencia de diferentes hormonas (ver con más detalle en *Resultados*) se realizó mediante un kit comercial de la casa Sigma. El procedimiento fue el propuesto por los responsables de la comercialización del producto. Las muestras fueron evaluadas utilizando el microscopio de contraste de fases (Microscopio invertido IX81 Olympus con una cámara digital DP72).

### **3.4.2 Hematoxilina-Eosina (HE).**

Se procedió a realizar una tinción con hematoxilina-eosina para comprobar qué le ocurría al cultivo de hMSCs después de 24 horas de incubación en presencia de partículas de Silicio Poroso infiltradas con Cobalto (SiPCo) y de éstas mismas conjugadas con PEG (SiPCoPEG). Según Wang F *et al.*, 2009, se puede observar contracción celular, formas irregulares, condensación nuclear..., por lo cual, todo esto nos indicaría que estaríamos en presencia de marcadores de apoptosis. Para ello, se siguió el protocolo de tinciones histológicas y se observaron las muestras en el microscopio de contraste de fases (Microscopio invertido IX81 Olympus con una cámara digital DP72).

### **3.5 ESTUDIO DE BIOMATERIALES.**

#### **3.5.1 Análisis de la superficie de biomateriales por las hMSCs aisladas de médula ósea.**

Como se indicó en la Introducción, las MSCs derivan del mesodermo y son las responsables de la formación del esqueleto óseo y su reparación. Consecuentemente éstas resultan idóneas para analizar los mecanismos celulares y moleculares de la regulación por factores de origen físico y las superficies de materiales destinados a andamios tisulares, contacto con tejidos y/o medicina personalizada, biotecnología, etc. Con esta finalidad hemos realizado los ensayos de proliferación/diferenciación de hMSCs con  $1,5 \times 10^4$  células en presencia de MC durante 72 horas (ó el tiempo especificado en *Resultados*). Los experimentos fueron llevados por triplicado.

##### **3.5.1.1 Policaprolactona con estructura honeycomb (PCLhc).**

La preparación de PCL (Aldrich,  $M_w = 10000$ ) con estructura hc se realizó en el Laboratorio of Molecular Surfaces and Interfaces (Facoltà di Scieze, Università degli Studi di Catania, Italia) por medio de *poly[neopentyl methacrylate]-block-(methacrylic acid)*] diblock-copolymer (PNPMA, Polymer Source,  $M_w = 20000$ ) como dopante anfifílico. Como precursor, se utilizó una solución de cloroformo de PCL (5%) y PNPMA (0,005%), y como sustrato, cubreobjetos de  $2 \times 2 \text{ cm}^2$ . El crecimiento de la estructura hc se llevó a cabo en una cámara cerrada controlando la humedad por burbujeo de  $N_2$  en agua MilliQ. La solución de PCL/PNPMA fue dispersada sobre la superficie hasta formar una monocapa estable donde crecen los poros por condensación autoensamblada del vapor de agua tras el enfriamiento producido por la evaporación del cloroformo. La modificación de las estructuras de PCLhc superficiales fue llevada a cabo en un reactor de deposición química en fase vapor asistido por plasma (PE-CVD), del inglés *Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition*. Se hicieron tres tipos diferentes de modificación: ataque por plasma de argón (Ar), ataque por plasma mixto de argón/oxígeno (ArO) y la deposición de alilamina (ALL), que fueron realizados en un reactor capacitivo equipado con una fuente de RF a 100 W. Para llevar a cabo el cultivo celular sobre las muestras de PCLhc, éstas fueron esterilizadas con etanol y colocadas en una placa de cultivo M24 y se procedió de la manera detallada anteriormente.

### 3.5.1.2 Estudios con Silicio - Silicio Poroso (Si/SiP).

#### A) Patrones de Si/SiP.

El método de síntesis elegido para la obtención de patrones de Si/SiP fue la anodización electroquímica en disoluciones de ácido fluorhídrico (HF) y etanol (Muñoz-Noval *et al.*, 2012) (Esquema 5). Para obtener el SiP se utilizaron obleas de silicio cristalino comerciales, de tipo p de baja resistividad ( $0.05\text{-}0.1\ \Omega\cdot\text{cm}$ ), con orientación cristalográfica 100 y pulida por una de las dos caras. Para realizar el ataque electroquímico se metalizó la cara no pulida del Si. La aparición de un patrón implica un proceso de irradiación previo que fue llevado a cabo con iones de  $\text{Si}^+$  de 4 MeV a través de una máscara de cobre de  $18\ \mu\text{m}$  de espesor, usando un acelerador tandetron Cockroft-Walton (High Voltage Engineering Europa B.V.) situado en el centro de microanálisis de materiales (CMAM-UAM). Después de la irradiación, las muestras fueron grabadas galvanostáticamente bajo iluminación (lámpara halógena de 150 W) en una solución 1:1 de HF (49%):etanol, con una densidad de corriente de  $100\ \text{mA}/\text{cm}^2$  durante 60 segundos dando lugar a estructuras de SiP esponjosas con un espesor de  $4\ \mu\text{m}$ .

Una vez sintetizados los patrones, se esterilizaron durante 10 minutos bajo luz UV en cabina de cultivo, se lavaron varias veces con PBS y se colocaron en una placa de 24 pocillos para estudiar la respuesta celular. Para ello, se sembraron hMSCs y se dejaron durante 72 horas en presencia de MC. Transcurrido el tiempo se fijaron y se guardaron a  $4^\circ\text{C}$  hasta realizar la inmunocitoquímica.



**Esquema 5.** Representación esquemática de los pasos a seguir para la formación de patrones de superficie de Silicio/Silicio Poroso (Si/SiP) (Muñoz-Noval *et al.*, 2012).



## **B) Partículas de SiP.**

El procedimiento completo para la fabricación de partículas de SiP está representado esquemáticamente en el Esquema 6 (Muñoz-Noval *et al.*, 2011) y consta de 4 pasos: 1) Los sustratos de silicio (tipo p, orientación <100> y resistividad 0.0-1-0.02  $\Omega \cdot \text{cm}$ ) fueron recubiertos en su cara posterior con aluminio mediante evaporación por haz de electrones y un proceso térmico rápido. 2) Las capas de SiP fueron fabricadas mediante grabado electroquímico del silicio en soluciones 1:1 de HF (48%): etanol (98). Las capas de SiP con espesores que van de 40 a 50  $\mu\text{m}$  se obtuvieron bajo condiciones de iluminación (lámpara halógena de 100 W) usando densidades de corriente desde 80 hasta 110  $\text{mA}/\text{cm}^2$  durante 400 s. 3) Electroinfiltración posterior de Cobalto (Co) mediante pulsos que se realizaron por inmersión de las capas de SiP en un baño Watts con sales de Co y con convertidores catalíticos adecuados. La composición del baño de Watts se muestra en la Tabla 1.

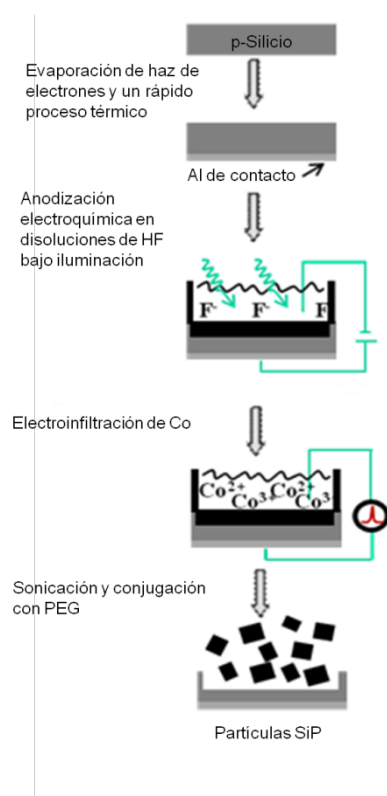
<i>Componentes</i>	<i>Concentración</i>
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 M
$\text{CoCl}_2$	0.05 M
Sacarina Sódica	5 g/l
$\text{H}_3\text{BO}_4$	0.4 M
$\text{H}_2\text{SO}_4$	1 mM
Agua	--

**Tabla 1. Composición del baño de Watts usado para la electroinfiltración del Co en SiP.**

4) Las partículas de SiP co-infiltradas con Co fueron obtenidas por sonicación y dispersión durante 20 minutos. El paso final de la conjugación se realizó de inmediato por inmersión en una solución de poli(etilenglicol)-600/tolueno (1% volumen). Estas partículas fueron expuestas al aire durante más de 1 hora para la estabilización de sus propiedades físico-químicas antes de la caracterización. Por último, cuatro ciclos de centrifugación (12 krpm, 5 minutos), eliminando el sobrenadante y volviendo a redispersar en una solución de etanol (sonicación, 10 minutos) fue aplicado a las partículas resultantes.

Una vez sintetizadas las partículas se realizaron ensayos de cultivo celular para comprobar si internalizaban en las células y además se determinó su posible citotoxicidad en el medio de cultivo por medio del ensayo MTT (ver más adelante). Las partículas fueron previamente preacondionadas. Para ello, preparamos alícuotas de 300  $\mu\text{l}$  a partir de un

stock de 25 g/L, las centrifugamos y lavamos con PBS para eliminar posibles restos de tolueno y equilibrar el pH. Se repitieron los lavados y las centrifugaciones con DMEM, y dejamos las partículas en este medio O/N. Después las añadimos a las hMSCs sembradas sobre gelatina y las dejamos en el cultivo 4 y 72 horas. Transcurrido el tiempo las fijamos, las lavamos, las deshidratamos para montarlas y las observamos en el microscopio de fluorescencia.



**Esquema 6.** Representación esquemática de los pasos a seguir para la formación de partículas de Silicio Poroso infiltradas con Cobalto (Muñoz-Noval *et al.*, 2011).

### 3.5.1.3 Soportes de Polietilenglicol-Polietilenglicol diacrilato con nanopartículas de titanio (PEG-PEGd-Ti).

Los materiales híbridos PEG-PEGd-Ti fueron formados por condensación simultánea de una mezcla sol-gel obtenida de dos soluciones independientes: 1) Una solución de isopropóxido de titanio (TIPT, Purum, Fluka, Hohengrunn, Germany) a 0,4 M en etanol, con la relación molar de TIPT/agua de 0,82 y pH de 1.27 controlado con HCl. La solución fue mantenida a RT durante 24 horas para la completa reacción de hidrólisis. 2) Una mezcla de la solución PEG y PEGd, disuelta en tricloroetileno al 5% p/v PEG ( $M_w = 6000$ , Fluka, Buchs, Switzerland) y un 2% p/v de PEGd ( $M_w = 258$ , Aldrich, Steinheim, Germany). El precursor final de los recubrimientos contenía 70% v (1) y 30% v (2). Las películas híbridas fueron obtenidas

sobre Si (100) por spin-coating a 2000 rpm durante 45 segundos. Estas películas fueron expuestas a modificación UV usando la radiación 365 nm de una lámpara de 12 W con tiempos de exposición de 2, 4 y 10 minutos.

Las hMSCs fueron usadas para estudiar la biocompatibilidad de los soportes obtenidos de PEG-PEGd-Ti en comparación con los controles de gelatina usados normalmente en los cultivos celulares.

#### **3.5.1.4 Hidrogeles híbridos de agarosa–3-aminopropiltrietoxisilano (APTS).**

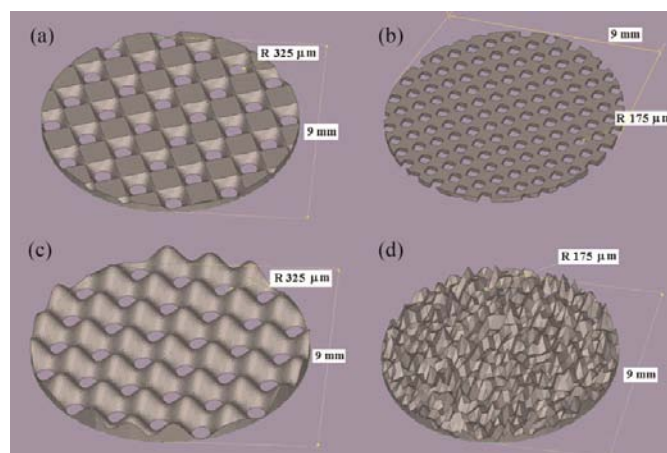
Los hidrogeles de agarosa (ultrapure electrophoresis grade, Gibco BRL) fueron preparados a concentraciones de 5% y con agua Milli-Q (18 kΩ cm) a 90°C. El APTS (Purum 96%, Fluka) fue añadido en alícuotas para mantener una relación proporcional de peso con respecto a la agarosa (% APTS / % agarosa = 1, 2, y 4). Los hidrogeles homogéneos de agarosa-APTS se prepararon sobre obleas de Si (100) de 1 x 1 cm<sup>2</sup> mediante enfriamiento desde 90°C hasta la gelificación en condiciones de RT. La biocompatibilidad de los soportes de agarosa-APTS fue ensayada por estudios de adhesión y proliferación de hMSCs durante 72 horas.

#### **3.5.1.5 Scaffolds de resina epoxi recubiertos con Diamond Like Carbon (DLC).**

Este tipo de materiales fueron aportados por el grupo de los doctores Pilar Lafont y Andrés Díaz Lantada de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM) (Departamento de Ingeniería Mecánica). La resina epoxi Accura® 60 (3D Systems, 333 Three D System Circle, Rock Hill, SC 29730 USA) fue usada como material base para los scaffolds diseñados utilizando estereolitografía láser. Posteriormente, las superficies de los prototipados fueron recubiertos con DLC (del inglés *Diamond Like Carbon*, con biocompatibilidad reconocida) utilizando los cátodos de grafito. Las superficies en este caso fueron lavadas antes y después de la polimerización con alcohol isopropílico. Finalmente los scaffolds fueron expuestos a luz UV durante 15 minutos a RT para llevar a cabo la esterilización y fueron lavados dos veces con PBS para eliminar las pequeñas impurezas que pudieran quedar antes de sembrar las hMSCs.

Las geometrías de los scaffolds fueron diseñados con la ayuda del software Solid Edge v.20 (Siemens Product Lifecycle Management Software Inc), y se guardaron como archivos con extensión .stl para la posterior comunicación con las máquinas de prototipado. Analizamos la

influencia de los diferentes tamaños de poro y la morfología de las superficies en el crecimiento de las hMSCs, por ello, se estudian cuatro modelos diferentes: dos eran sustratos planos 2D (Diseños A y B) y dos eran scaffolds 3D, con superficie regular (Diseño C) o irregular, denominada también, superficie fractal (Diseño D). Los tamaños de poro eran comparados a dos niveles, los diseños A y C eran de 650  $\mu\text{m}$  de diámetro y los diseños B y D de 350  $\mu\text{m}$ . El irregular scaffold 3D (Diseño D) fue diseñado de acuerdo a un reciente método propuesto por el grupo, basado en el uso de fracciones de superficies fractales. El Esquema 7 muestra los cuatro diseños diferentes obtenidos.



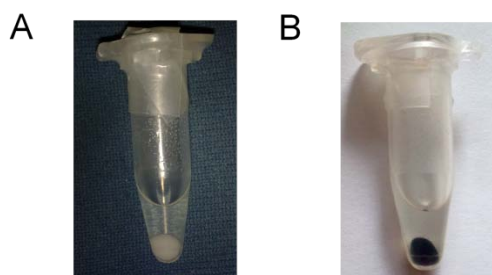
**Esquema 7. Scaffolds con superficies y tamaños de poro diferentes.** a) Diseño A, scaffold 2D con poros de 650  $\mu\text{m}$  de diámetro. b) Diseño B, scaffold 2D con poros de 350  $\mu\text{m}$  de diámetro. c) Diseño C, scaffold 3D con superficie ondulada regular. d) Diseño D, scaffold 3D con superficie irregular (fractal).

### **3.5.1.6 Cultivo de hMSCs en microesferas para condrogenesis.**

La posibilidad de usar polímeros en forma de esferas es enormemente interesante por su flexibilidad para formar andamios de tamaños y formas diferentes. Se utilizaron dos tipos de microesferas (Esquema 8), PCL y quitosano (CHT), para favorecer la condrogenesis de hMSCs, haciendo cultivo tipo “pellet” como comentamos en el apartado anterior. Para ello se usaron 30 mg partículas/200.000 células y se realizó el cultivo en tubos Falcon de 15 ml. Las esferas fueron preacondicionadas de la siguiente manera:

Se pesaron las microesferas en PBS y se esterilizaron con etanol absoluto. A continuación se centrifugaron las partículas y se eliminó el sobrenadante (repitiendo este paso 1 ó 2 veces más) para dejar O/N en etanol. Se centrifugaron de nuevo, se lavaron con PBS (5 veces) y se

acondicionaron con el medio de cultivo. Se diferenciaron las células y se analizaron por inmunocitoquímica.



**Esquema 8. Microesferas de PCL (A) y de CHT (B) para cultivo condrogénico.**



## ***4. Resultados***





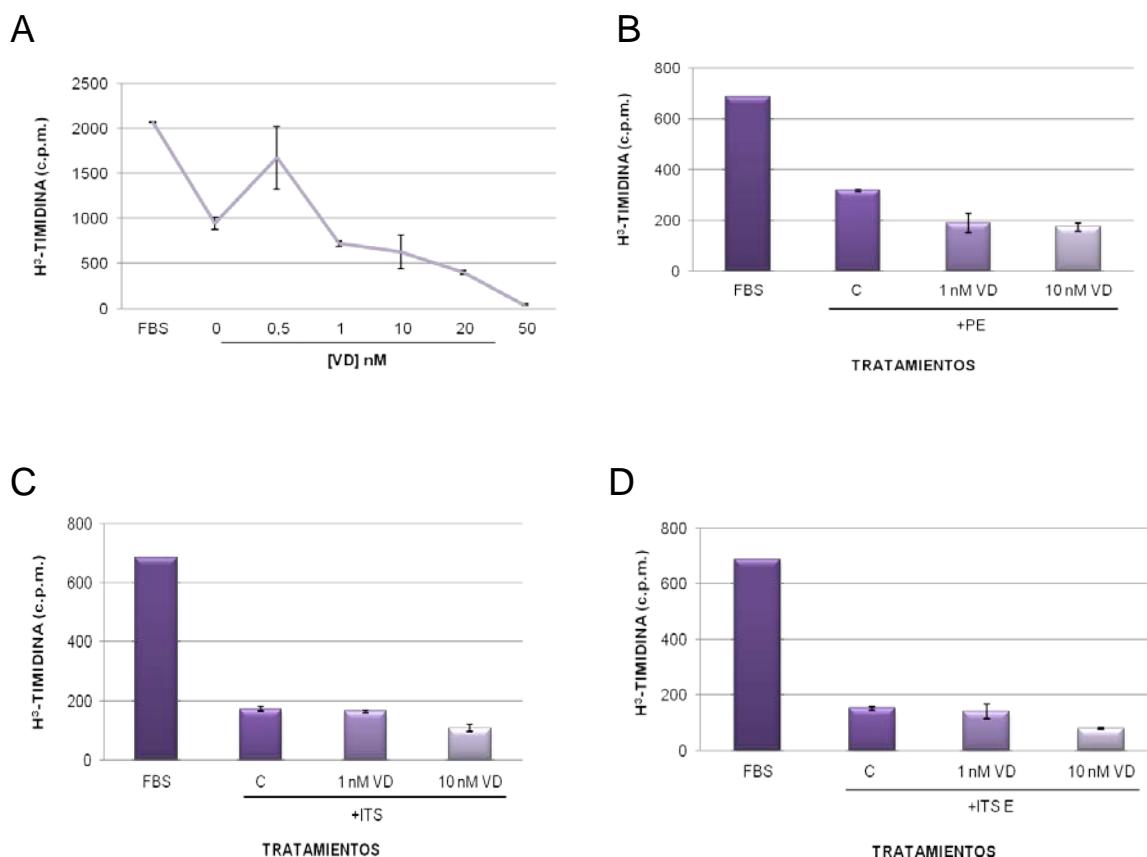
## Acción de la VD en las células progenitoras de hueso aisladas de médula ósea.

Como se detalla en la *Introducción*, está bien establecido que la VD es un regulador del metabolismo óseo y su receptor (VDR) es expresado en las células progenitoras. Sin embargo, existen lagunas de conocimiento sobre las bases celulares y moleculares del sistema regulador VD-VDR que tienen lugar tanto en la formación, como en la reparación de los tejidos del esqueleto y su patología asociada. Nuestro grupo también ha mostrado interés por las hMSCs aisladas de médula ósea, mostrando la plasticidad osteo-condro-adipo y estudiando la acción de la prolactina, los estrógenos y la dexametasona. Conscientes de la plasticidad de estas células nos hemos planteado estudiar el sistema VD-VDR y su posible relación con la regulación de los otros ejes reguladores previamente estudiados.

### 4.1 La VD reduce la velocidad de proliferación de las hMSCs.

Está descrito que el VDR se expresa en multitud de tipos celulares (Wang Y *et al.*, 2012), en las derivadas de osteosarcoma de rata (Pols *et al.*, 1990) y en las de neuroblastomas (Bini *et al.*, 2012) entre otras. Artaza *et al.*, 2010, muestran que la VD inhibe la proliferación celular de C3H 10T<sub>1/2</sub> (ensayo con formazán), modifica la morfología celular incrementando el tamaño, y además, promueve la parada del ciclo celular. La proliferación celular de las hMSCs fue valorada mediante dos métodos: determinando la velocidad relativa de incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina al DNA y la proporción de núcleos positivos para Ki67 según se indica en *Materiales y Métodos*. En ambos casos el tiempo usado en el análisis de la VD fue de 72 horas, el medio de incubación básico DMEM-LG, 15 x 10<sup>3</sup> células sembradas y concentraciones nanomolares de VD. En cada determinación se incluyeron dos controles: como control positivo de proliferación se utilizó la inducción causada por el suero (FBS) y otro negativo (C) sin FBS correspondiendo al valor de incorporación de timidina inducida por los posibles factores endógenos de las hMSCs. Los resultados obtenidos son la media de tres experimentos diferentes, y cada uno de ellos fue realizado con triplicados de cada tratamiento y se muestran en la Fig. 1. En la Fig. 1A, la presencia de VD en concentraciones de 0,5 a 50 nM, es capaz de reducir la velocidad de proliferación de las células progenitoras de hueso. El efecto inhibitor de la VD se mantuvo cuando las células se incubaron en presencia de dos agentes inductores de la proliferación la prolactina (P) (Ogueta *et al.*, 2002) y los estrógenos (E) (Okada *et al.*, 2010), Fig. 1B. Igualmente se hicieron determinaciones en paralelo en medios conteniendo insulina (ITS) usado en la diferenciación osteocondral, tanto en ausencia como en presencia de E, Figs. 1C y 1D, respectivamente. Los resultados muestran que la VD tiene un efecto inhibitor dominante de la proliferación de las hMSCs. Este resultado ya se

había descrito en trabajos previos en células derivadas de osteosarcoma de rata (Pols *et al.*, 1990). También tiene efecto en la vía de señalización celular de la insulina, la prolactina y los estrógenos, y además podemos decir que en un porcentaje independiente del ligando inductor de la proliferación como muestran las Figs. 1B, C y D.

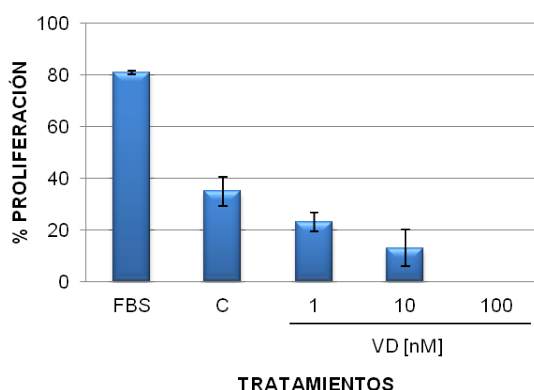


**Figura 1. Efecto de la VD en la proliferación de las hMSCs.**  $15 \times 10^3$  células fueron sembradas en placas M24 y la proliferación celular se estimó durante 72 horas mediante la incorporación de  $1 \mu\text{Ci/ml}$  de  $^3\text{H}$ -timidina al DNA de las hMSCs durante las 16 últimas horas y tratadas posteriormente con distintas concentraciones nanomolares de Vitamina D (VD) (A), el control positivo (10% FBS) y control negativo (C) de proliferación, Prolactina (P,  $40 \text{ ng/ml}$ ), Estrógenos (E,  $40 \text{ nM}$ ), Insulina, Transferrina y Selenio (ITS,  $6,25 \mu\text{g/ml}$  cada uno) y Vitamina D (VD,  $1$  y  $10 \text{ nM}$ ) (B, C y D). Las células fueron lisadas y el DNA recuperado según se indica en *Materiales y Métodos*. La radiactividad se midió utilizando un programa  $^3\text{H}$  en un contador de centelleo líquido. Los resultados de proliferación son la media de tres experimentos independientes y se han expresado en cuentas por minuto (c.p.m.) de  $^3\text{H}$ -timidina incorporadas al DNA.

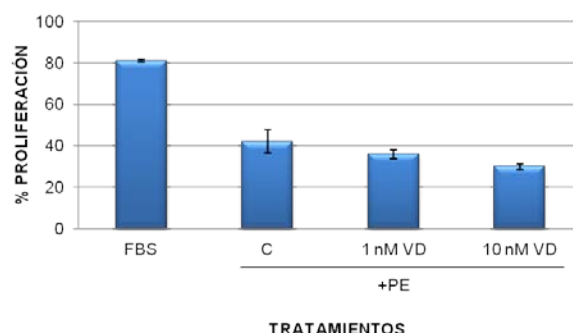
Los resultados anteriores fueron comprobados utilizando el análisis de la expresión de Ki67. Las células fueron incubadas en idénticas condiciones a las que se reportan en la Fig. 1 y la proteína Ki67 fue cuantificada por inmunocitoquímica. Los resultados se expresaron en % de células positivas de Ki67 en relación a 500 núcleos teñidos con DAPI. Los resultados se muestran en la Fig. 2 y puede observarse que se confirma el papel inhibitor de la VD en las

hMSCs y en la diferenciación osteocondral, aunque como podría esperarse varían los porcentajes según la técnica usada. La reducción de la proliferación causada por la VD fue de parada total a una concentración de 100 nM (Fig. 2A). Respecto a la presencia de los agentes inductores P y E, vemos que la adición de VD hace que se vea disminuida nuevamente como se observa en la Fig. 2B, indicando que la VD tiene un efecto inhibitor dominante sobre la acción proliferativa de la P y los E.

A



B

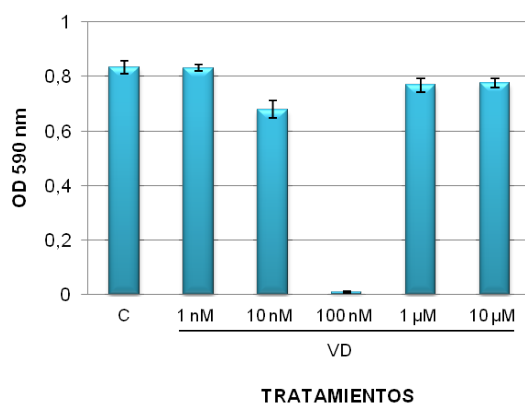


**Figura 2. Cuantificación de la proliferación de las hMSCs en presencia de VD y de las hormonas prolactina y estrógenos.** Las células fueron sembradas en cubres pretratados con gelatina en placas M24 y la proliferación celular se estimó mediante la determinación de Ki67 por inmunocitoquímica donde las hMSCs estuvieron 24 horas de ayuno y después fueron tratadas o no durante 72 horas con: el MC que fue usado como control positivo de proliferación (FBS), el control negativo (C), concentraciones nanomolares de Vitamina D (VD, 1 y 10 nM), Prolactina (P, 40 ng/ml) y Estrógenos (E, 40 nM). Los resultados se han expresado en porcentaje de núcleos de células marcados con Ki67 respecto al control.

Para descartar si las concentraciones nanomolares de VD que estábamos usando tenían algún efecto citotóxico en las hMSCs, realizamos un ensayo de viabilidad celular denominado MTT (van de Loosdrecht *et al.*, 1994). Se analizaron las concentraciones de VD utilizadas en los resultados de la Fig. 1 y se analizó también el efecto de 100 nM, 1  $\mu$ M y 10

$\mu\text{M}$  de VD para disponer de un rango de concentración más amplio. Cada concentración se analizó por triplicado y los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar.

Como muestra la Fig. 3, en general, no se observan cambios significativos en la viabilidad celular con respecto al control a excepción de la concentración de 100 nM VD. Ésta parece afectar a la proliferación como muestra la baja absorbancia medida a 590 nm y como pudimos comprobar en el medio de cultivo, ya que muchas de las células no sobrevivían las 72 horas. Este efecto también fue observado a altas concentraciones de hormonas tiroideas (100 nM de T3) en cultivos de osteoblastos donde se inhibía la replicación celular (Klaushofer *et al.*, 1995). Podría ser interpretado que en ausencia de FBS, una concentración de 100 nM de VD disminuye la adhesión celular, compatible con situaciones de migración o una diferenciación final con aumento de la apoptosis.



**Figura 3. Efecto de la VD en la viabilidad celular.** La posible citotoxicidad de la VD usada en el cultivo de hMSCs se precisó evaluando la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico MTT. Se determinó tras 72 horas de cultivo en DMEM-LG con concentraciones crecientes de VD (1, 10 y 100 nM; 1 y 10  $\mu\text{M}$ ). Después se midió la absorbancia de cada muestra en un espectrofotómetro a 590 nm y utilizando un filtro de referencia de 620 nm. Cada concentración se analizó por triplicado y los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar.

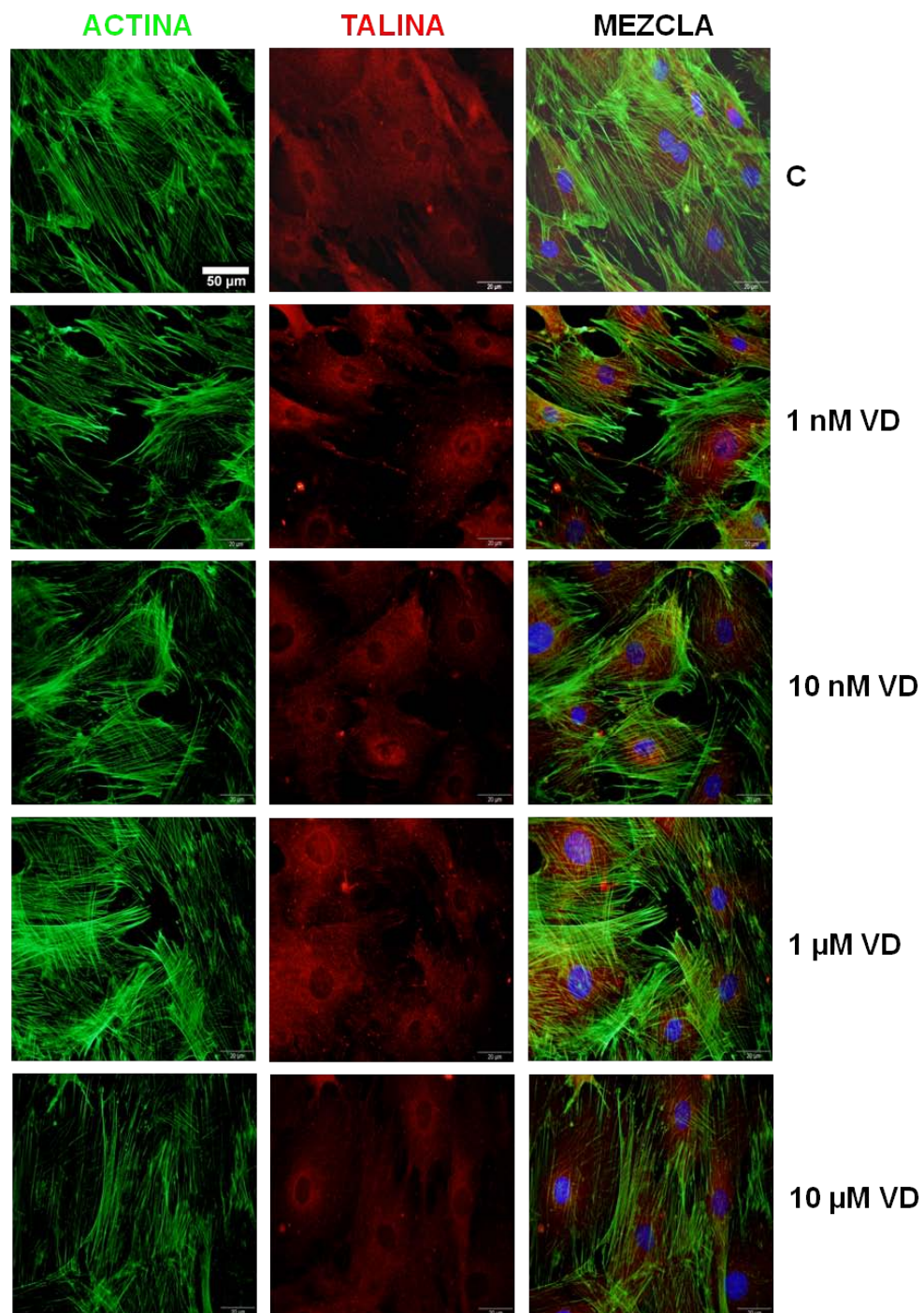
### 4.2 La VD es responsable de la morfología celular de las hMSCs regulando el citoesqueleto.

La organización del citoesqueleto es reconocida como un excelente indicador del estado energético celular (la actina necesita ATP para su polimerización, mientras que los microtúbulos requieren GTP), de la respuesta a estímulos químicos y físicos del medio extracelular, de la migración y del crecimiento/diferenciación o apoptosis. Considerando los resultados obtenidos en el apartado anterior, nos preguntamos cuál sería el efecto de la VD en el citoesqueleto. Con esta finalidad incubamos las hMSCs durante 72 horas en presencia

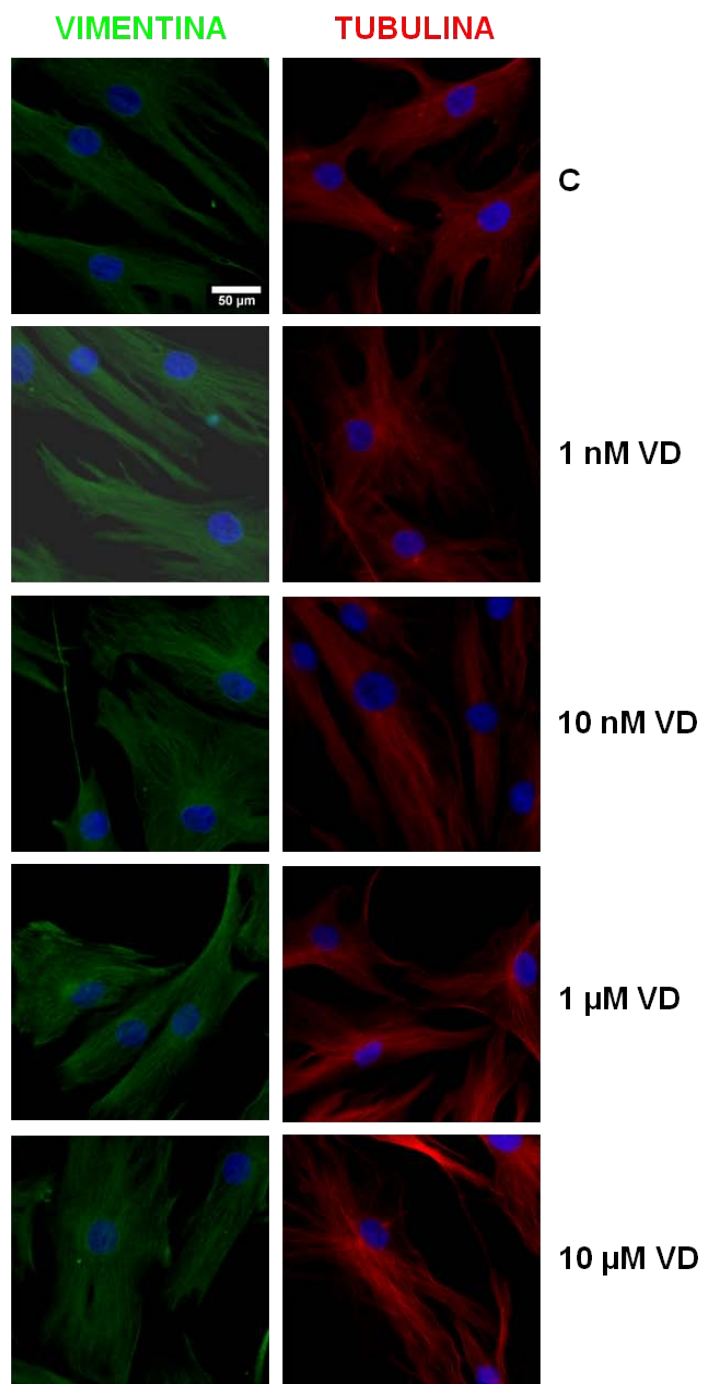
de MC y con concentraciones crecientes de VD y analizamos posteriormente por inmunocitoquímica, como se indica en *Materiales y Métodos*, los filamentos de actina, la talina (proteína ligadora a los filamentos de actina), los filamentos intermedios mediante vimentina y los microtúbulos con  $\beta$ -tubulina. El DNA nuclear de las células fue teñido con DAPI. Los experimentos fueron repetidos con células de diferentes donantes y cada experimento se realizó en triplicado. En la Fig. 4 se muestra un ejemplo que resume los resultados obtenidos. En la Fig. 4A, vemos que las hMSCs en presencia de MC muestran una morfología fibroblástica, con numerosos filamentos de actina en forma de fibras de estrés y la talina distribuida uniformemente por la superficie celular. Los resultados sugieren que la presencia de 1 nM de VD en el medio causa un efecto de acortamiento en las fibras de estrés, mientras que la talina se encuentra con una distribución perinuclear. Estos cambios parecen más agudos cuando se incrementa diez veces la concentración de VD. Se aprecia la actina en la superficie celular, la estructura de la célula se torna triangular indicando adhesión y contractilidad celular. Con 1  $\mu$ M de VD, la actina es compatible con una morfología redondeada en la mayoría de las células mientras que cuando incubamos con 10  $\mu$ M de VD, se observan unas células grandes donde los filamentos de actina dibujan las fibras de estrés de toda la superficie celular. Con respecto a la talina, no se observan cambios en las concentraciones micromolares, permaneciendo distribuida por la célula.

Los filamentos intermedios y los microtúbulos (Fig. 4B) son el resultado de una adhesión celular donde la morfología de las hMSCs se aprecia alargada, mostrando las dimensiones de la célula. Los microtúbulos se encuentran polarizados y se puede observar hasta la posición del centrosoma. Esto ocurre en todos los casos, tanto en presencia de MC como de VD. Por tanto, los resultados muestran que la VD induce cambios en la organización del citoesqueleto de las hMSCs en presencia de MC y durante el tiempo estudiado, ya que interviene en la regulación de los cambios necesarios compatibles con los morfológicos (forma redondeada, alargada y fibroblástica), migración, polaridad y diferenciación celular.

A



B

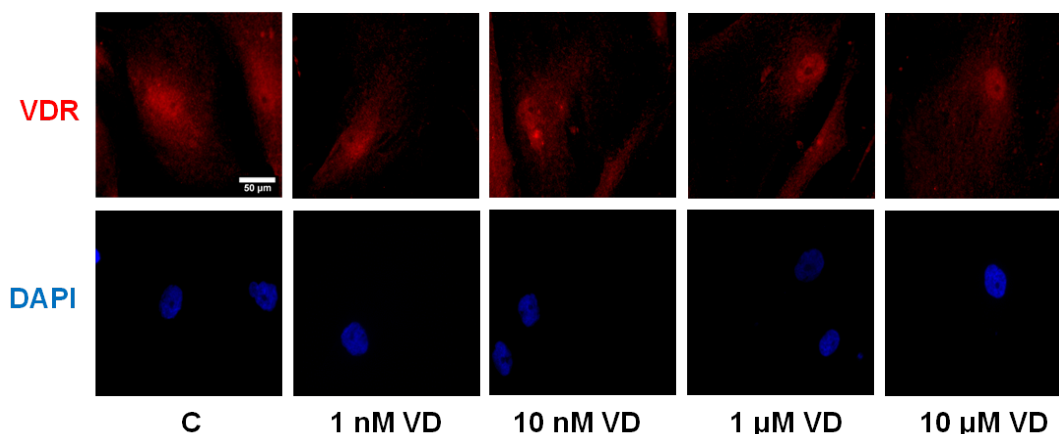


**Figura 4. Organización del citoesqueleto de las hMSCs en presencia de VD.** Las células fueron cultivadas en MC suplementado con concentraciones crecientes de VD (1 y 10 nM; 1 y 10 μM) durante 72 horas (siendo C el control de crecimiento). Mediante inmunocitoquímica se analizó el estado de las proteínas del citoesqueleto. Los anticuerpos específicos usados fueron Ph488 para detectar actina, y talina usando como secundario Alexa 555 (A); vimentina (Alexa 488) y tubulina (Alexa 555) (B). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las fotografías se realizaron con un aumento del 40x en un microscopio de fluorescencia OLYMPUS IX81 acoplado a una cámara CCD monocroma y color.



### 4.3 Expresión y localización del VDR en las hMSCs.

La acción celular de la VD es mediada por un receptor específico, el receptor de vitamina D (VDR), miembro de la familia de receptores nucleares, cuyos mecanismos celulares y moleculares son menos conocidos que otros miembros del grupo. Los resultados obtenidos de la valoración del VDR por inmunocitoquímica se muestran en la Fig. 5. Las hMSCs expresan la proteína VDR, y como receptor nuclear, se encuentra en el núcleo de las células. El tratamiento con diferentes concentraciones de VD no modifica la situación con respecto al control y el VDR se localiza ligeramente en el citoplasma y preferentemente en la región nuclear. Estos resultados coinciden con la teoría ya que dependiendo de dónde se localice la VD, el receptor se localizará en el citoplasma y se translocará al núcleo tras la activación, o bien, se mantendrán en el núcleo esperando que entre la VD y lo active. Barsony *et al.*, 1997, encontró en fibroblastos que una substancial proporción de VDR residía en el citoplasma (no era exclusivamente nuclear) y colocalizaba con el retículo endoplasmático, el complejo de Golgi y los microtúbulos. Podemos sugerir que en el MC y en el tiempo estudiado de 72 horas, la localización del VDR en las hMSCs no se ve afectado por la concentración de la VD.



**Figura 5. Expresión y localización del VDR en las hMSCs.** Las células fueron cultivadas en MC suplementado con concentraciones crecientes de VD (1 y 10 nM; 1 y 10  $\mu$ M) durante 72 horas. Se estudió la distribución del VDR mediante inmunocitoquímica con un anticuerpo específico para el receptor, VDR, y el secundario Alexa 555. Los núcleos de las células fueron teñidos con DAPI. Las fotografías se realizaron con un aumento del 60x en un microscopio de fluorescencia OLYMPUS IX81 acoplado a una cámara CCD monocroma y color.

### 4.4 ¿Modula la VD la acción proliferativa inducida por la prolactina y los estrógenos?

Es conocido que la VD juega un papel importante en promover la diferenciación celular ósea de ratón, rata y humano (Luegmayr *et al.*, 2000). Igualmente, el efecto de la VD ha sido estudiado en las células progenitoras de hueso. Los datos encontrados concuerdan en atribuir



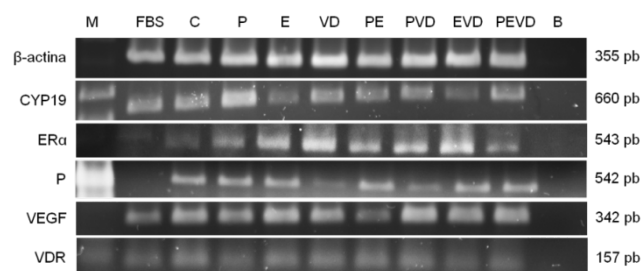
a la VD un papel dominante en la diferenciación osteocondral de las hMSCs similar al de los glucocorticoides. Por eso, nos propusimos estudiarla en presencia de dos hormonas implicadas en hueso: Prolactina (P) y Estrógenos (E). El receptor de prolactina (PR) se expresa en el esqueleto humano durante el desarrollo embrionario (Freemark *et al.*, 1997) y los animales KO tienen alteraciones óseas y retraso en la calvaria (Ormandy *et al.*, 1997), lo cual atribuye a la prolactina una función prioritaria en la biología del esqueleto de los vertebrados. Además nuestro grupo puso de manifiesto que el sistema regular P-PR es un eje regulador del esqueleto óseo y de las hMSCs (Ogueta *et al.*, 2002; Romero-Prado *et al.*, 2006). Con respecto a los E, se sabe que participan en el metabolismo óseo y que la pérdida de los mismos puede provocar osteoporosis (Manolagas 2010), una de las enfermedades degenerativas del hueso que afecta a gran número de personas. Consecuentemente con lo expuesto, estudiamos la posible relación entre la prolactina, los estrógenos y la vitamina D en las hMSCs, analizando el citoesqueleto y factores de transcripción.

#### **4.4.1 La VD modula genes implicados en la diferenciación osteocondral.**

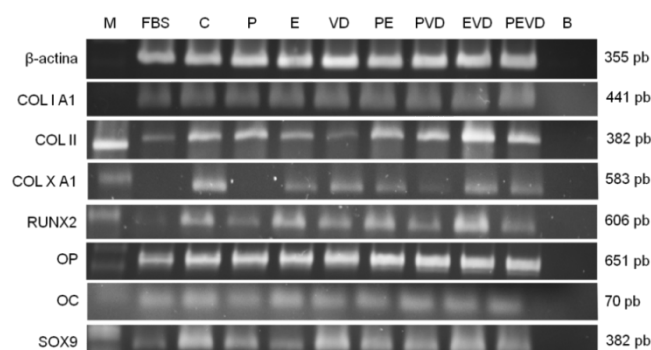
Con esta finalidad, utilizamos  $1 \times 10^6$  hMSCs crecidas al 80% de confluencia y por duplicado fueron tratadas con los factores P, E y mezcla de ellos, en las concentraciones indicadas al pie de la Fig. 6. Los tratamientos fueron realizados durante dos semanas y como controles utilizamos el de crecimiento (FBS), el de diferenciación (C) y el negativo de la PCR sin cDNA (B) procedente de la RT-PCR. Como se explica en *Materiales y Métodos*, se realizaron las RT-PCRs comparativas para analizar los diferentes transcritos y la normalización del DNA utilizado en cada muestra mediante la amplificación del transcrito correspondiente a la  $\beta$ -actina (control de carga). Los productos amplificados fueron analizados en geles de agarosa tratados con BrEt para visualizar las bandas específicas. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 6. En la Fig. 6A se puede observar que las hMSCs en presencia de MC o en medio de diferenciación osteocondral, expresan el mRNA de la enzima aromatasa (CYP19) del metabolismo del estradiol responsable de la aromatización del anillo A, del receptor de estrógenos tipo  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), de la prolactina (P), del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y del VDR. Esto mismo ocurre en presencia de VD y mezcla de las hormonas. También se analizó el efecto de la VD sobre los genes implicados en el desarrollo del hueso. En la Fig. 6B se muestra que las hMSCs expresan transcritos de las proteínas específicas de la matriz extracelular (varios tipos de colágenos), el factor Runx2 que media la diferenciación osteocondral, así como la osteocalcina (OC), la osteopontina (OP) y Sox9. Como se podía esperar, la VD no produjo alteraciones en la expresión de los genes implicados en el desarrollo del hueso en ninguno de los casos estudiados. Finalmente analizamos la expresión de genes, que de una manera o de otra

participan en el esqueleto óseo, y propusimos varios, como los genes implicados en el eje regulador de hueso Hh-Ptc (Smo); en la diferenciación celular, embriogénesis y desarrollo (TGF- $\beta$ 3); en el metabolismo energético (c/EBP $\alpha$ ) y en la actividad osteocástica (IL-6). Nuevamente los resultados que se muestran en la Fig. 6C sugieren que la VD, en cualquiera de los casos estudiados (incluso en presencia de prolactina y estrógenos), no altera la expresión de las hMSCs aisladas de médula ósea por los factores utilizados y confirman su linaje osteocondral.

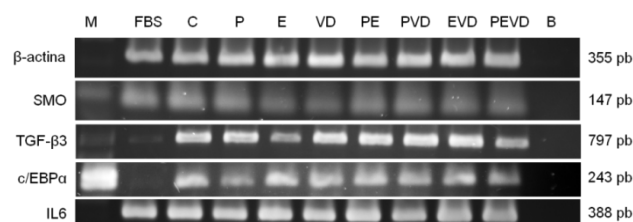
A



B



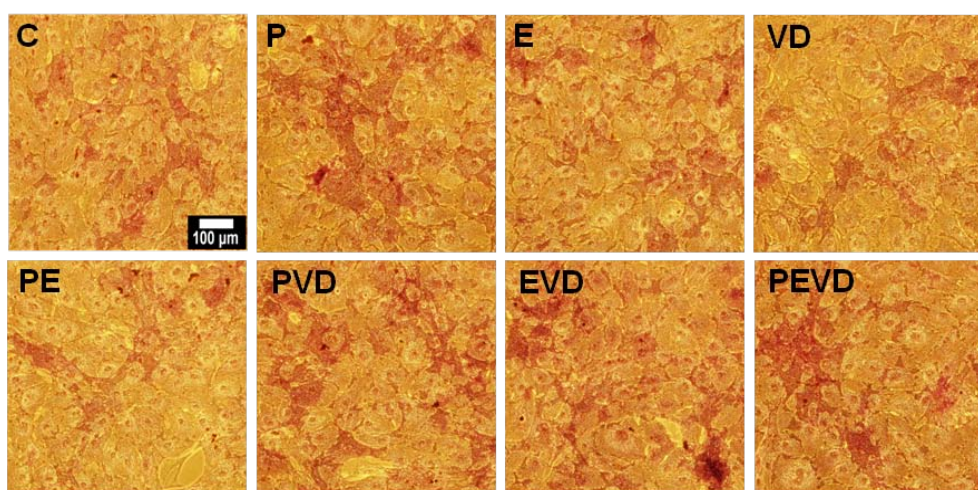
C



**Figura 6. Expresión de genes implicados en el esqueleto óseo y en la diferenciación osteocondral en las hMSCs por RT-PCR.** El RNA total fue aislado de  $1 \times 10^6$  células incubadas durante dos semanas en medio de diferenciación, en ausencia (C) o en presencia de factores reguladores: 40 ng/ml P, 40 nM E, 1 nM VD y mezcla de ellos. Se realizaron las PCRs usando los oligos y las condiciones experimentales descritas en *Materiales y Métodos*. El gel fue teñido con BrEt mostrando los productos esperados de las PCRs. (A) Expresión de la enzima Aromatasa (CYP19), ER $\alpha$ , P, VEGF y VDR. (B) Expresión de genes específicos de hueso. (C) Expresión de genes implicados en el eje regulador de hueso (Smo); en la diferenciación celular, embriogénesis y desarrollo (TGF- $\beta$ 3); en el metabolismo energético (c/EBP $\alpha$ ) y en la actividad osteocástica (IL-6). En la parte superior de la imagen aparecen: M, marcador  $\Phi$ 29-HindIII utilizado; FBS, el control positivo de proliferación; C, el control de diferenciación; los diferentes tratamientos y B, el control negativo de la PCR (sin cDNA).

#### 4.4.2 La VD modula la expresión de la ALP.

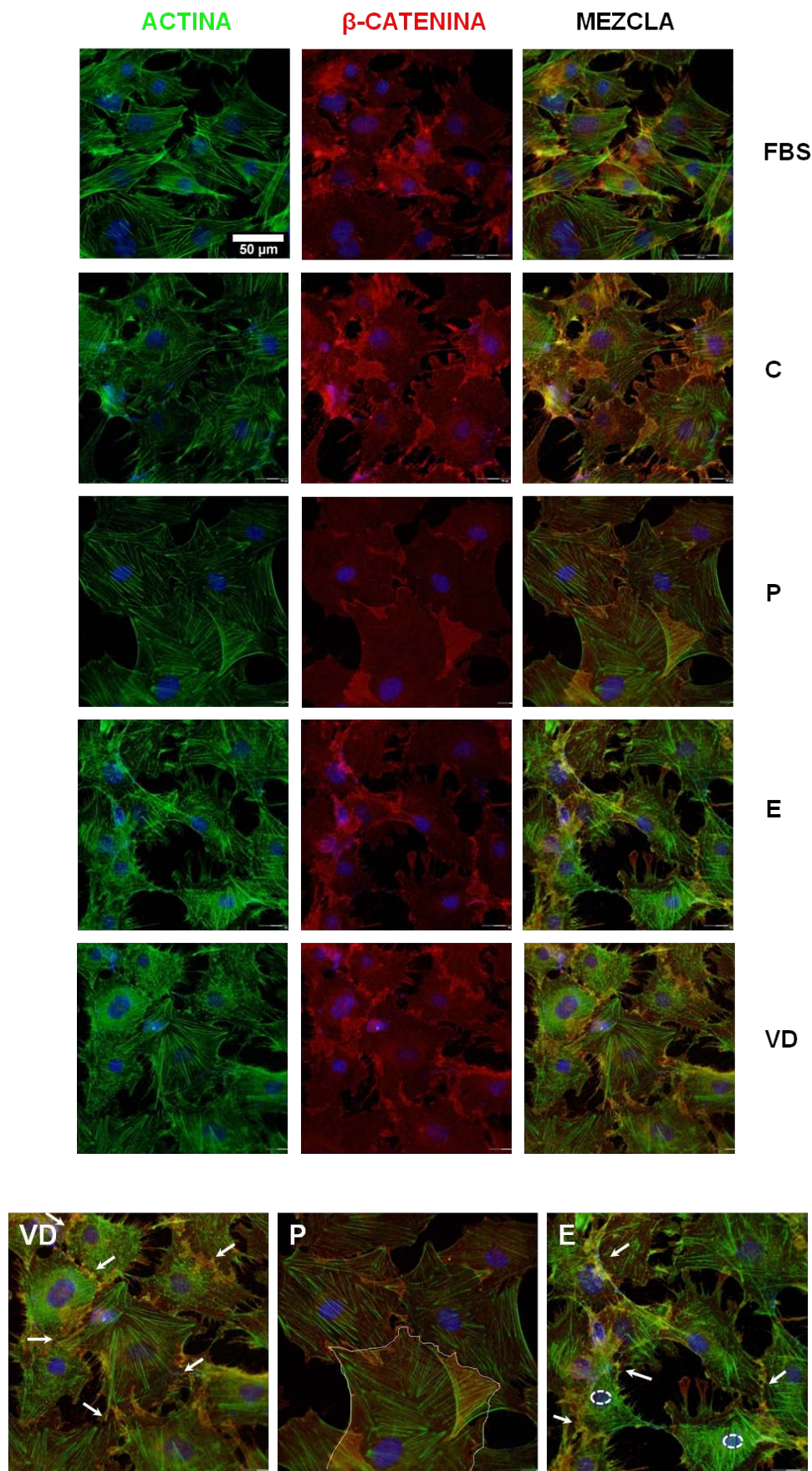
La actividad enzimática fosfatasa alcalina (ALP) esquelética es específica del hueso. Ésta es una glicoproteína que se encuentra en la superficie de los osteoclastos. La función no está todavía clara, aunque se ha demostrado que es un indicador bioquímico del recambio del hueso y se cree que podría participar en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblásticas. Nos preguntamos cómo sería la expresión de ALP en las hMSCs diferenciadas durante una semana en presencia de VD, P, E y mezcla de ellos. Para ello realizamos una tinción celular según se indica en *Materiales y Métodos*, y se realizaron las imágenes en un microscopio de contraste de fases (Microscopio invertido IX81 Olympus con una cámara digital DP72). Un ejemplo de los resultados obtenidos es la imagen característica de cada tratamiento de los tres experimentos que fueron realizados. En la Fig. 7 se puede observar que las células positivas para ALP se encuentran teñidas de color rojo, y se dan en todos los casos, pero es necesario destacar que en presencia de P, PVD, EVD y PEVD, se hicieron evidentes los nódulos mineralizados poniendo de manifiesto la buena calidad de la mineralización de la ALP, confirmada además mediante la coloración de la enzima. Resultados que están de acuerdo con los obtenidos por la actividad de la osteocalcina (Hewison M. 2010) y de los estrógenos (Taskiran *et al.*, 2011). Por tanto, los resultados muestran que la VD incrementa la ALP en hMSCs, y éste efecto se hace más notable en presencia de P y E.



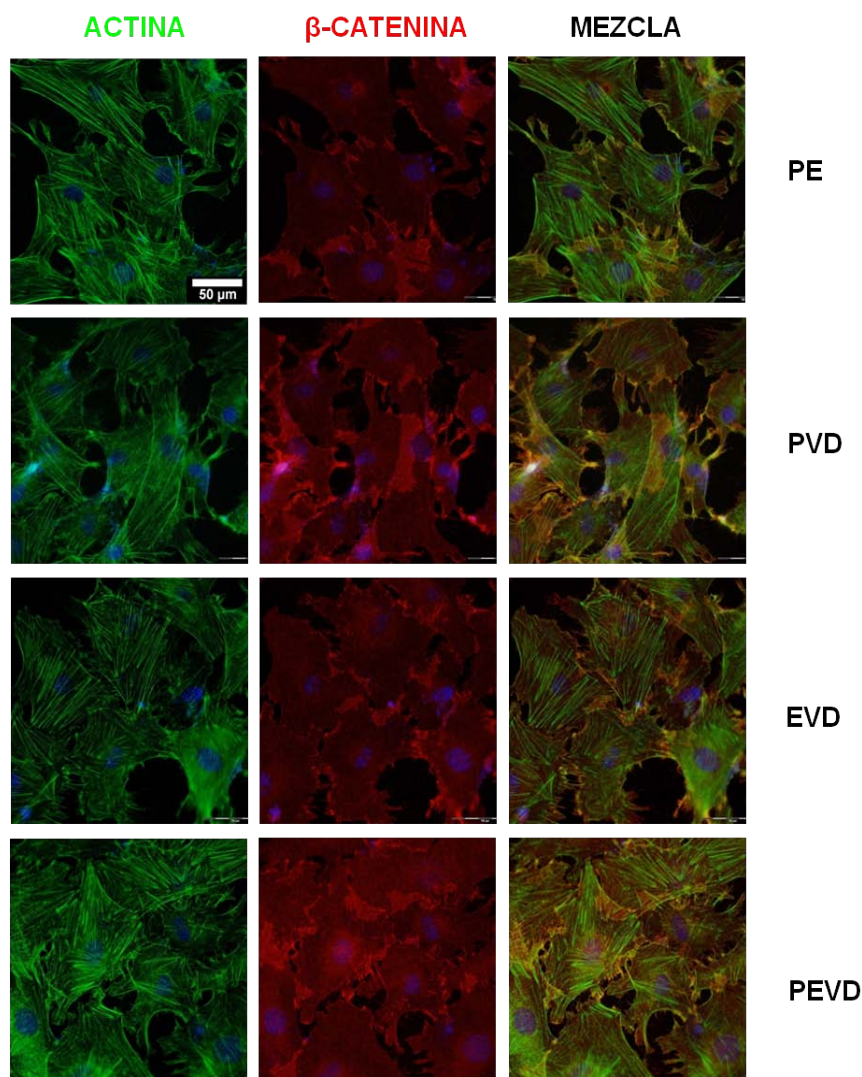
**Figura 7. Expresión de la fosfatasa alcalina en hMSCs diferenciadas durante una semana.** Se cultivaron las células en medio de diferenciación osteocondral en presencia de 1 nM VD, 40 nM E y 40 ng/ml P, y se detectó la ALP por medio de una tinción celular según se explica en *Materiales y Métodos*. Las células se observaron y se fotografiaron en un microscopio óptico de contraste de fases (Olympus IX81 invertido con una cámara digital DP72) con un aumento del 20x.

#### **4.4.3 La VD en la adhesión celular.**

Cómo dijimos anteriormente, el citoesqueleto es un buen indicador de la situación en la que se encuentran las células, ya que es el responsable de multitud de funciones. Nos preguntamos cuál sería la organización del citoesqueleto de las hMSCs durante una semana de diferenciación osteocondral en presencia de los tratamientos: FBS (control de crecimiento), C (control de diferenciación), P, E, VD y la acción conjunta de estos factores reguladores. La concentración de VD utilizada fue de 1 nM, la menor de las utilizadas en la literatura y que no tiene efecto tóxico en las hMSCs como se muestra en el ensayo de viabilidad celular de la Fig. 3. Vemos en la Fig. 8 que las células sometidas a diferenciación pierden la morfología fibroblástica característica de las hMSCs (como muestran en proliferación y en plástico), adquieren una morfología más redondeada, de células más grandes y crece el número de puntos de anclaje. Estos aspectos ya fueron visualizados inicialmente por Henson JH 1999, y describía que cambios en la organización estructural del citoesqueleto de actina acompañaban a cambios en el volumen celular. Los resultados muestran que las células tratadas con VD tienen gran cantidad de uniones celulares con respecto a los controles. La P conduce a unas células de gran volumen con adhesiones y fibras de estrés, mientras que los E, inducen la aparición de un gran número de adhesiones donde coinciden actina con catenina, pero no se observan signos indicativos de un aumento del volumen celular sino una reducción del diámetro nuclear. Cuando las células se trataron con ambos ligandos, el efecto de los E se reduce y aumenta el tamaño nuclear y las adhesiones celulares. La VD tiene un efecto dominante en las hMSCs con cambios compatibles con la diferenciación, al contrarrestar los efectos de la P, E o la mezcla de ambos. Se observa en la Fig. 8, un ejemplo representativo mostrando las fibras de actina mayoritariamente distribuidas por toda la célula indicando un volumen tridimensional bien mantenido energéticamente y numerosas adhesiones célula-célula. Los resultados muestran que la VD está implicada en cambios en las proteínas del citoesqueleto cuando se diferencian las células a hueso, ya que induce moléculas de adhesión como se observa por la aparición del color amarillo en los múltiples puntos de adhesión.





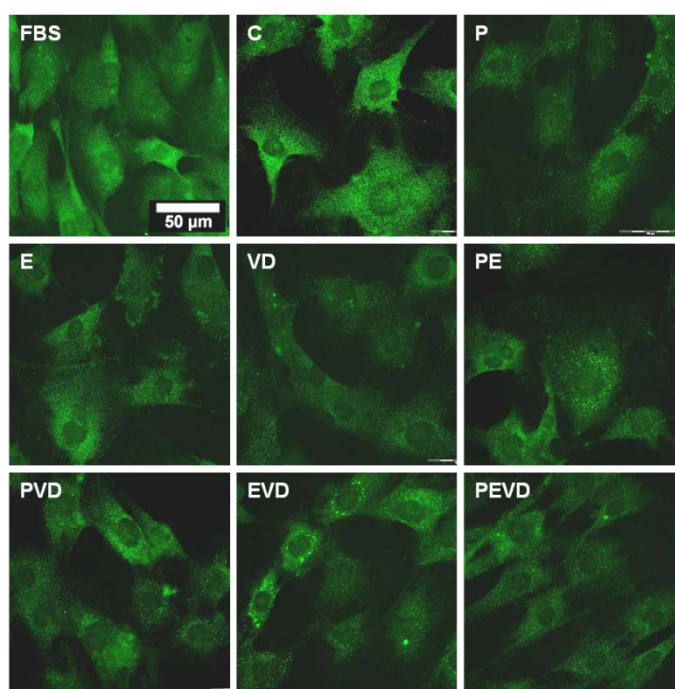


**Figura 8. Organización del citoesqueleto durante la diferenciación ósea de las hMSCs.** Las células fueron cultivadas durante 24 horas para estabilizarlas, seguidamente se ayunaron y se incubaron con diferentes tratamientos durante una semana: FBS (es el control de crecimiento), C (es el control de diferenciación ósea), P (Prolactina, 40 ng/ml), E (Estrógenos, 40 nM), VD (Vitamina D, 1 nM) y combinaciones de ellos. Transcurrido el tiempo se fijaron las células y se analizó el estado del citoesqueleto mediante inmunocitoquímica con actina (Ph488) y con un anticuerpo específico para  $\beta$ -catenina y su secundario Alexa 555. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Las fotografías se realizaron con un aumento del 60x en un microscopio de fluorescencia OLYMPUS IX81 acoplado a una cámara CCD monocroma y color. También se muestra una figura con imágenes de VD, P y E resumiendo los efectos más destacados.

#### 4.4.4 Estudio de la expresión del VEGF en presencia de VD.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un potente inductor de la formación de vasos sanguíneos durante el desarrollo embrionario y del tropismo celular (vasculogénesis). Tiene un papel fundamental en el crecimiento de vasos nuevos en el adulto (angiogénesis) y en la reparación del hueso (Carlevaro *et al.*, 2000). Caplan *et al.*, 2006 y Phinney DG 2007, describieron la producción de VEGF por las hMSCs, y nos preguntamos si

la P, los E y la VD regulan la síntesis proteica del VEGF. Como es previsible, la expresión del VEGF permanece constante en las hMSCs independientemente del tratamiento realizado, como se puede ver en la Fig. 9. Los resultados sugieren que quizás la función principal del eje prolactina y su receptor sea intervenir en la vasculogénesis, al igual que los otros miembros de la familia de citoquinas como son la Epo y la GH. Además los resultados coinciden con Ormandy *et al.*, 1997, y con datos previos del laboratorio Ogueta *et al.*, 2002 y Olazabal *et al.*, 2009.



**Figura 9. Expresión del VEGF en las hMSCs diferenciadas.** Las células se mantuvieron una semana en medio de diferenciación óseo con 1 nM VD, 40 nM E, 40 ng/ml P y mezcla de ellos. Después de realizó una inmunocitoquímica con el anticuerpo específico para VEGF y el secundario Alexa 488. Las imágenes se realizaron con un aumento del 60x en un microscopio de fluorescencia OLYMPUS IX81 acoplado a una cámara CCD monocroma y color.

#### **4.4.5 Expresión y localización de los factores de transcripción Runx2, Sox9 y RXR $\alpha$ específicos de las hMSCs y de la diferenciación ósea.**

La siguiente pregunta planteada fue estudiar la expresión y la localización de tres factores de transcripción implicados en la diferenciación ósea como son Runx2, Sox9 y RXR $\alpha$ . La proteína RUNX2, es el factor de transcripción clave asociado con la diferenciación de los osteoblastos (Stein *et al.*, 2004 (A)). Pertenece a la familia de factores de transcripción RUNX y tiene un dominio Runt de unión a DNA. Es esencial en la diferenciación osteoblástica, en la morfogénesis del esqueleto, actúa como una proteína estructural para los ácidos nucleicos y factores reguladores implicados en la expresión génica relacionada con el esqueleto (Stein *et al.*, 2004) y en la maduración del condrocito (Yoshida *et al.*, 2004).

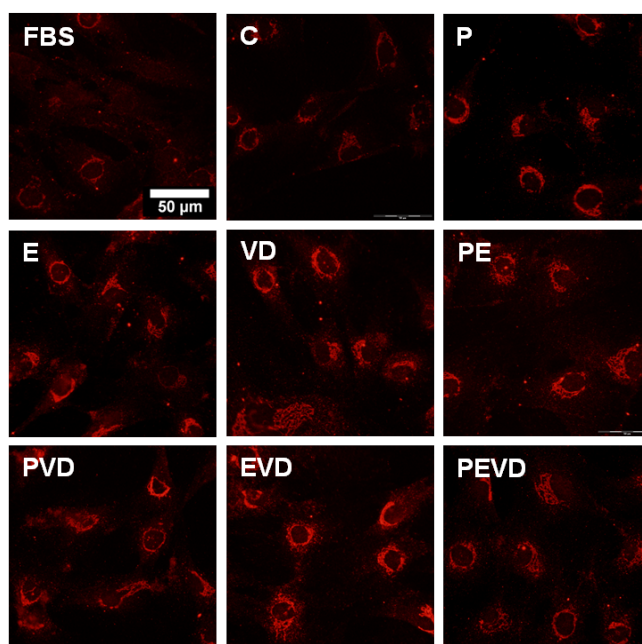
Nuestro grupo demostró que las hMSCs son progenitoras osteocondrales (Romero-Prado *et al.*, 2006). Expresan el factor de transcripción específico de hueso Runx2/AML3 cuando las células se cultivan en presencia de suero. En condiciones de diferenciación, expresan además los transcritos del eje regulador Indian Hh-PTHrP, sus moléculas de traducción de señal (Ptc, Smo e Ihh) y los factores de transcripción Gli. Además, uno de los factores más importantes para el control del crecimiento y desarrollo del cartílago, es Sox9. Se define como un factor de transcripción condroprogenitor que se expresa a nivel de los condrocitos diferenciados (Papadopoulou *et al.*, 2007), regulando la expresión del colágeno tipo II, IX, XI y el agregano, y por ello se identifica como un regulador del linaje de condrocitos.

Por otro lado, el RXR (*Receptor X Retinoide*) es un miembro de la familia de factores de transcripción de receptores de hormonas tiroideas y esteroideas. Ejerce su acción mediante la unión como homo- o heterodímeros. Generalmente forma heterodímeros con VDR, ya que la acción celular de la VD consiste en unirse a su receptor, translocarse al núcleo y formar el heterodímero con RXR (MacDonald *et al.*, 2001). Este se une a regiones promotoras de genes específicos en los tejidos diana (VDREs) formando complejos con proteínas coactivadoras y corepresoras de la transcripción (Tagami *et al.*, 1998), aumentando o disminuyendo la expresión de los genes que participan en el metabolismo óseo y mineral. Por tanto, como mencionamos anteriormente, abordamos el estudio de la expresión y la localización de estos tres factores de transcripción en las condiciones de tratamiento de la Fig. 8. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 10. Como se puede observar en la Fig. 10A, tanto en los controles como en los diferentes tratamientos, Runx2 de forma general se localiza en la región perinuclear de las hMSCs, donde en el caso de la VD podemos ver que aumenta su expresión, e incluso frente a los controles. Son varios los trabajos que indican la interacción entre Runx2 y VDR en osteoblastos. Paredes *et al.*, 2004 demostraron que en células osteoblásticas, expresando el gen de la osteocalcina, el VDR interaccionaba directamente con Runx2. Mientras Marcellini *et al.*, 2010, hicieron un estudio de evolución de la interacción que se producía entre Runx2 y VDR, y se pudo comprobar que estos dos factores de transcripción (implicados en la osteoblastogénesis) interaccionaban directamente en vertebrados, permitiendo la activación transcripcional de genes que participan en la mineralización de la matriz extracelular. Lo mismo ocurre con la localización perinuclear de Sox9 (Fig. 10B), pero no tiene ese efecto tan localizado y definido como en el caso de Runx2. También se encuentra sutilmente en el citoplasma y ocurre en todos los casos. Sin embargo, el RXR $\alpha$  se expresa normalmente en el núcleo y además presenta sitios activos de transcripción que sólo aparecen cuando las células se están diferenciando ya que en el control de proliferación no se ven (Fig. 10C). Los resultados sugieren que la P induce un aumento en la proporción del receptor en el núcleo celular mientras que los E inducen el efecto contrario, aumentan fuera, y la VD nuevamente manifiesta su acción dominante negativa a la acción de los E. Cuando tenemos PE juntos, el efecto individual de los E

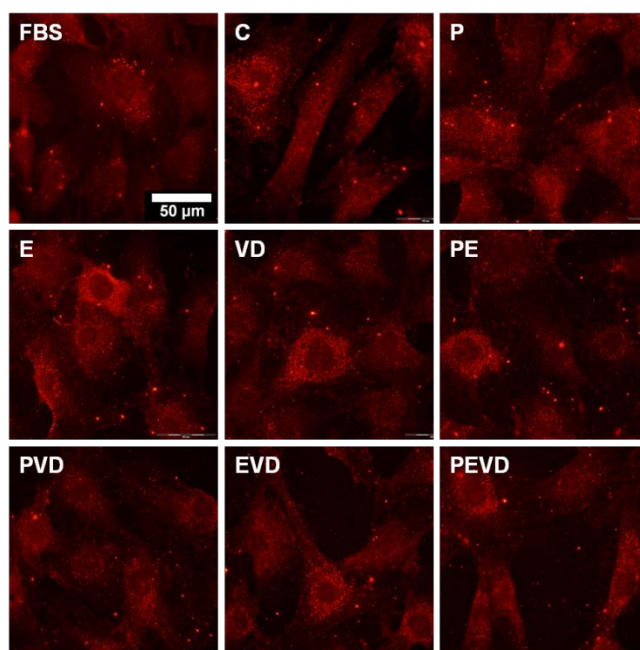


desaparece, pero esto no ocurre en presencia de EVD, donde el efecto es menos acentuado. En presencia de las tres hormonas en cultivo, la P y la VD lideran sobre la acción de los E. Los resultados muestran que la VD modula la composición de los transcriptomas de las hMSCs en diferenciación de una manera muy eficaz, al poder alterar la suma de las acciones de P y E, no sólo mediante la regulación de su receptor sino también del RXR.

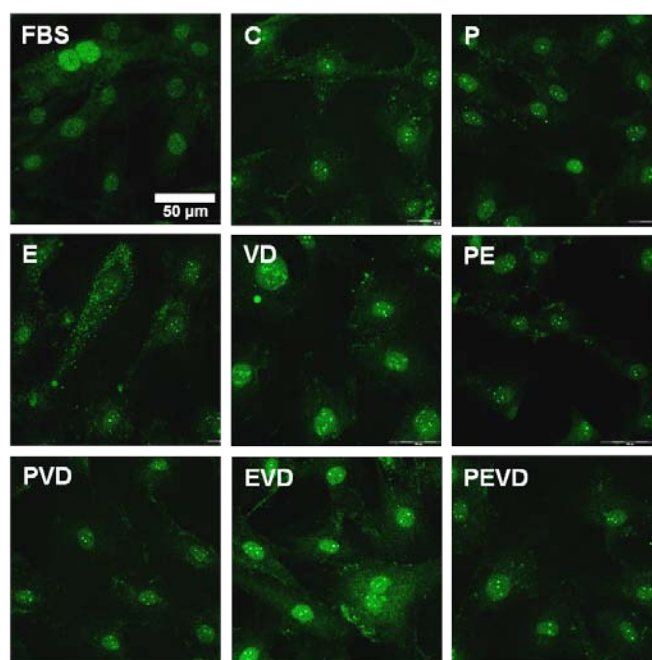
A



B



C



**Figura 10. Expresión y localización de factores de transcripción específicos de la diferenciación ósea en las hMSCs.** Las células fueron diferenciadas durante una semana y en presencia o no de 40 ng/ml P, 40 nM E, 1 nM VD y mezcla de ellos. Transcurrido el tiempo se realizó una inmunocitoquímica con: (A) Runx2 (Alexa 555), (B) Sox9 (Alexa 555) y (C) RXR $\alpha$  (Alexa 488), para estudiar la distribución de dichos factores. Las imágenes se realizaron con un aumento del 60x en un microscopio de fluorescencia OLYMPUS IX81 acoplado a una cámara CCD monocroma y color.

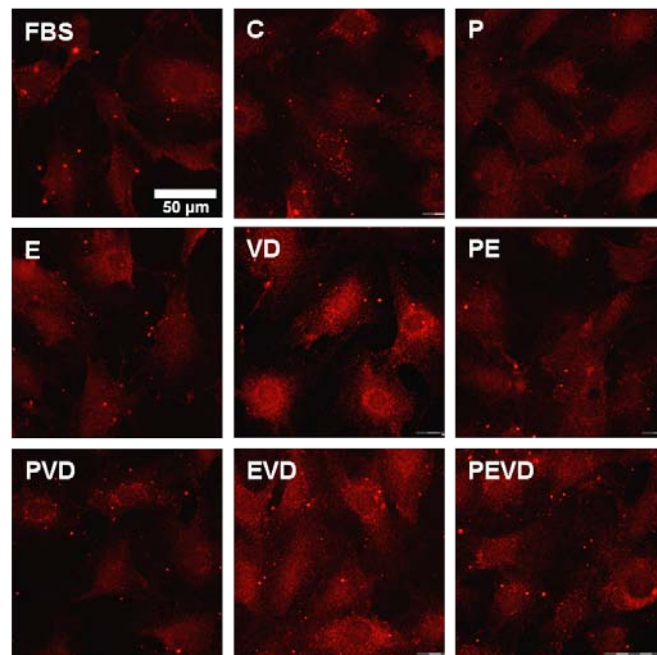
#### 4.4.6 Expresión de los factores de transcripción c/EBP $\alpha$ /EBP $\beta$ y GR implicados en el metabolismo energético.

Los c/EBPs (CCAAT/enhancer binding protein) son una familia de factores de transcripción asociados con la respuesta de fase aguda, con la diferenciación de las células mesenquimales en linajes celulares específicos (Umek *et al.*, 1991; Lekstrom-Himes and Xanthopoulos, 1998) como la diferenciación adipogénica y además se encuentran implicados en el metabolismo energético de la célula, como el c/EBP  $\alpha$  y  $\beta$ .

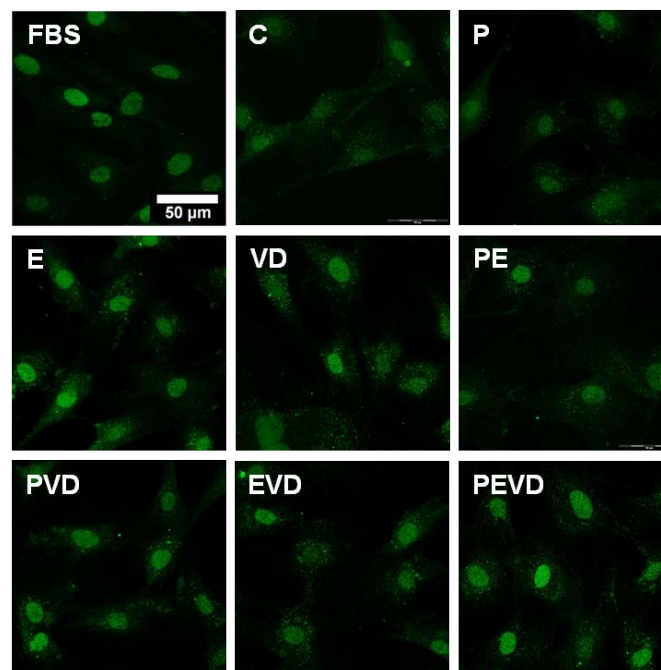
El receptor de glucocorticoides (GR) también regula genes implicados en desarrollo, metabolismo y respuesta inmune. Se trata de uno de los muchos receptores nucleares que constituyen una superfamilia de factores de transcripción que regulan la expresión génica de forma dependiente de ligando. Entre los miembros de esta familia se incluyen los receptores para las hormonas esteroideas, como el GR. Nos propusimos estudiar la posibilidad de que c/EBP $\alpha$ , c/EBP $\beta$  y GR pudieran estar regulados por VD, P y E, ya que son genes implicados en el metabolismo energético y están presentes en los transcriptomas específicos de hueso. Las condiciones celulares son idénticas que en el punto 4.4.5. Los resultados se muestran en

la Fig. 11. En la Fig. 11A puede verse que, en todos los casos, el c/EBP $\alpha$  se encuentra asociado con los filamentos intermedios de la matriz, como ha sido observado en estudios de distribución subcelular de factores de transcripción (Barsony *et al.*, 1997). Destaca el caso de las células tratadas con VD, donde la proporción de c/EBP $\alpha$  aumenta preferentemente en la región perinuclear. Esto también ocurre en presencia de E y VD juntos. Hasta el momento, no hay ninguna relación entre c/EBP $\alpha$  y VD en células de hueso, pero los resultados concuerdan con lo descrito por Dhawan *et al.*, 2009, donde se sugiere que c/EBP $\alpha$  es inducido por VD y además es un potente activador de la transcripción de VDR en una línea celular de cáncer de mama. En cuanto al c/EBP $\beta$  (Fig. 11B), vemos que se dispone de forma mayoritaria en el núcleo de las hMSCs siendo indiferente de los tratamientos utilizados. Sin embargo, parece que c/EBP $\beta$  está más implicado que c/EBP $\alpha$  en el esqueleto (Henriquez *et al.*, 2011), ya que participa en el destino de las hMSCs hacia la diferenciación de adipocitos, condrocitos y osteoblastos (Smink *et al.*, 2012). Esto parece concordar con las diferentes isoformas de c/EBP, que muestran una regulación y una función que son específicas de célula/tejido. Se sabe que c/EBP $\beta$  es inducido por VD en osteoblastos, y junto con el VDR, tienen un papel regulador en la transcripción de la osteocalcina (Gutierrez *et al.*, 2002; Villagra *et al.*, 2006). También se manifiesta que las hormonas implicadas en hueso, Runx2 y  $\beta$ -ESR, están interaccionando tanto física como funcionalmente en la actividad que podría directamente afectar al crecimiento del esqueleto (Centrella *et al.*, 2004). En el caso del GR (Fig. 11C), no se observa ningún cambio significativo en los tratamientos utilizados. Está descrito que el receptor de glucocorticoides ha demostrado ser capaz de interaccionar con c/EBP $\beta$  (Dhawan *et al.*, 2010). Es un trabajo realizado en osteoblastos y en presencia de Dexametasona (Dex), que demuestra que GR coopera con c/EBP $\beta$  para activar la transcripción de 24(OH)asa mediada por VDR. Por tanto, sólo observamos un aumento c/EBP $\alpha$  en presencia de VD y EVD, mientras que c/EBP $\beta$  y GR no sufren cambio alguno en las condiciones de estudio analizadas.

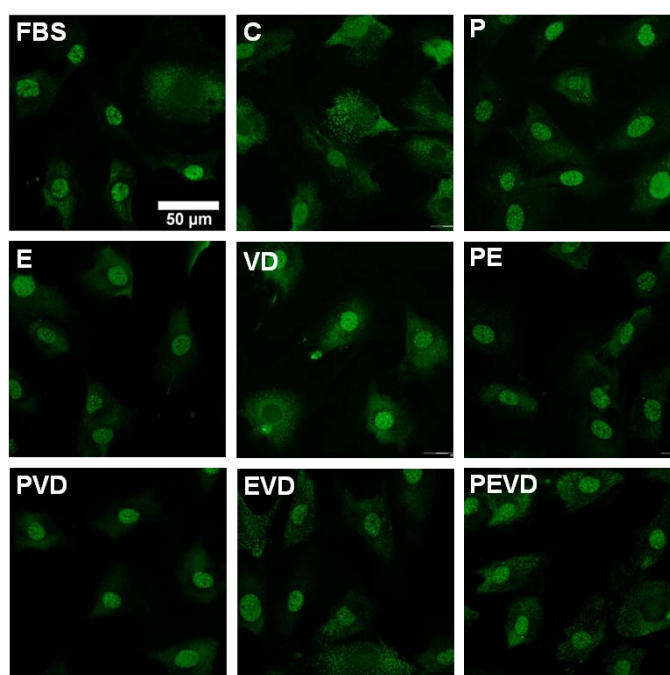
A



B



C



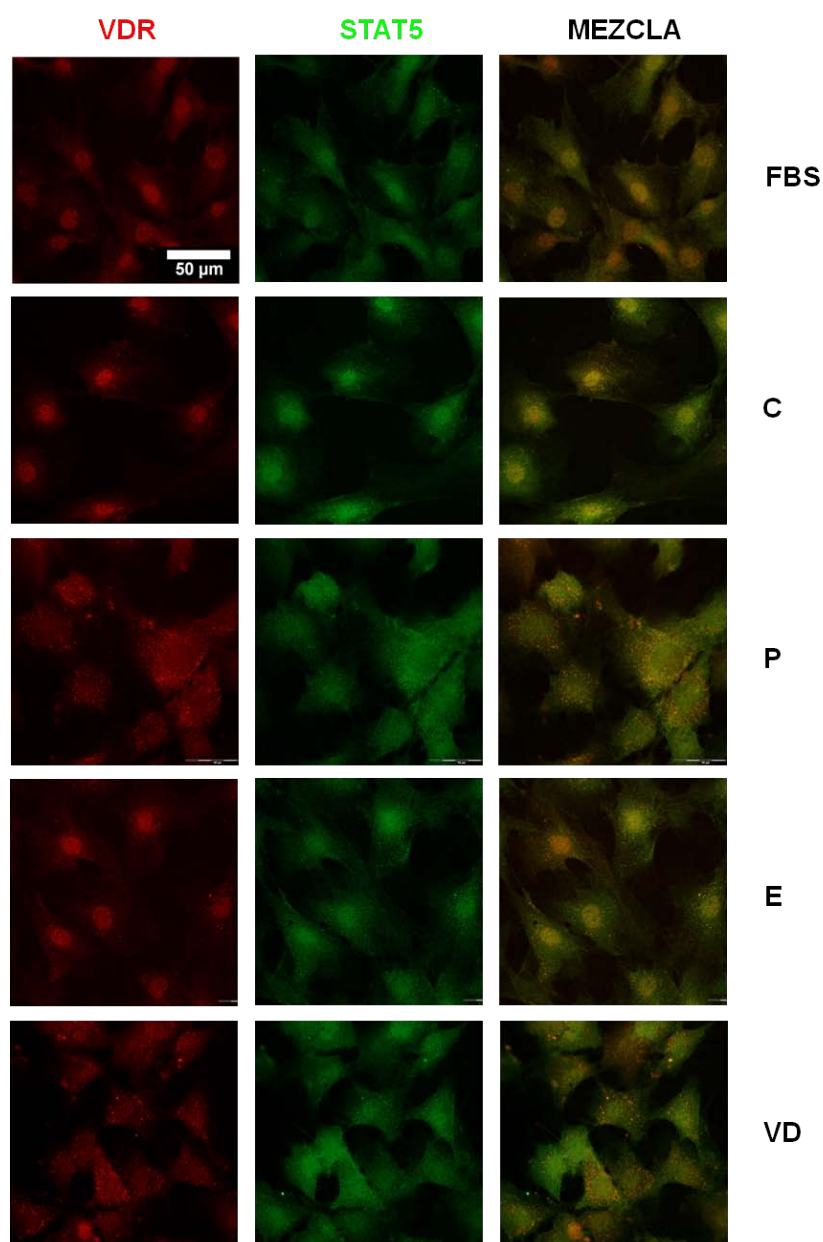
**Figura 11. Expresión y localización de factores de transcripción implicados en el metabolismo energético en las hMSCs.** Se cultivaron las células durante una semana en medio de diferenciación en presencia de los diferentes tratamientos (40 ng/ml P, 40 nM E, 1 nM VD y mezcla de ellos), en las mismas condiciones celulares que en el punto 4.4.5. A continuación se fijaron las células y se estudió por inmunocitoquímica la localización de: (A) c/EBP $\alpha$  (Alexa 555), (B) c/EBP $\beta$  (Alexa 488) y (C) GR (Alexa 488). Las fotografías se realizaron con un aumento del 60x en un microscopio de fluorescencia OLYMPUS IX81 acoplado a una cámara CCD monocroma y color.

#### 4.4.7 En la interacción de VDR con STAT5.

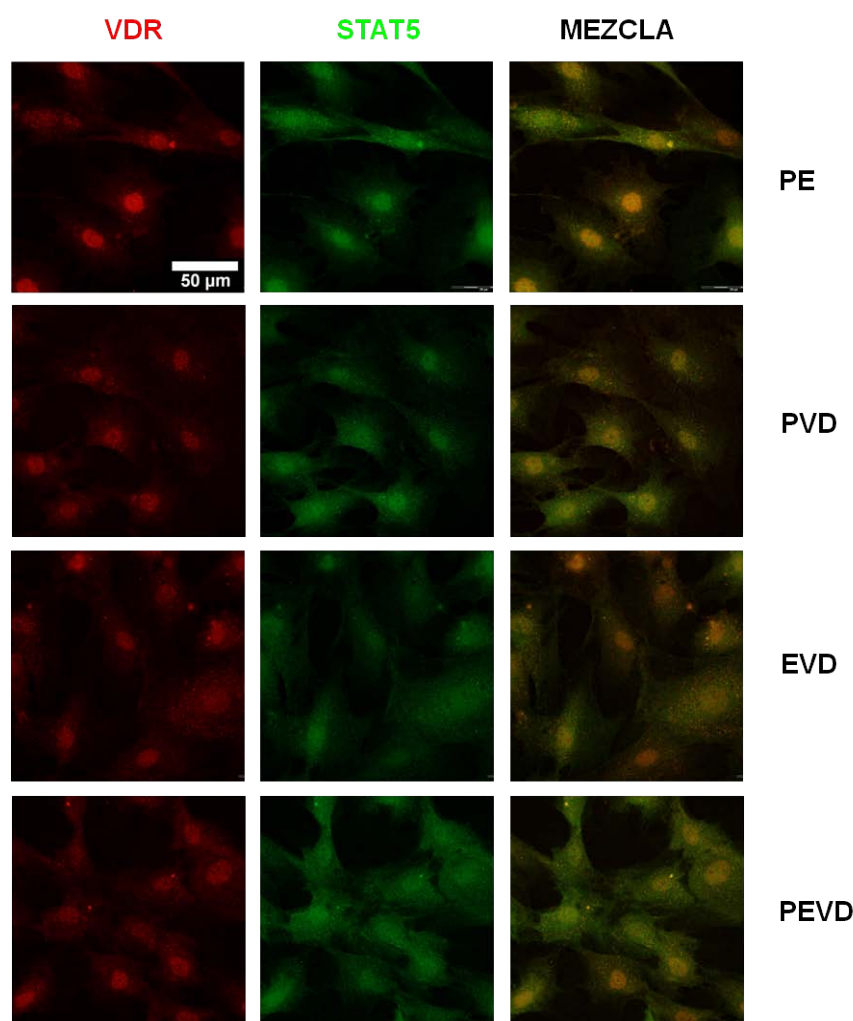
Las proteínas STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) son una familia de factores de transcripción (constituida por 7 miembros en los humanos) que se encuentran en el citoplasma antes de la unión de las citoquinas al receptor. La STAT5 ha estado implicada en múltiples funciones celulares como proliferación, diferenciación y apoptosis, procesos de hematopoyesis y de inmunoregulación, reproducción y metabolismo lipídico (Grimley *et al.*, 1999). Analizamos la modulación de este factor y el VDR, diferenciando las células durante una semana y en presencia de P, E, VD y mezcla de ellos. Se muestra en la Fig. 12 que el VDR y la STAT5 colocalizan en el núcleo de las células tanto en presencia de FBS como en el control de diferenciación. Esta situación es alterada de manera notoria y dominante sobre el proceso de diferenciación ósea. La señal producida por P es compatible con la salida del núcleo tanto del VDR como de STAT5 que se detectan en la parte citosólica, pudiendo ser compatible con una asociación al Golgi. La correspondiente a VD es similar a la inducida por P, sin embargo, el tratamiento con E induce una localización

## Resultados

nuclear de ambos. Los resultados muestran que los E tienen una acción dominante sobre la P al estar el VDR colocalizado con STAT5 en el núcleo. Esta colocalización se mantiene de manera dominante en la localización asociada al citoesqueleto de la STAT5. Los resultados muestran la plasticidad de las hMSCs en su diferenciación ósea por P que activa directamente la vía tirosina quinasa y, E y VD, que pueden ser regulados por su vía canónica y/o no canónica. Morales *et al.*, 2002, estudiaron a lo largo del tiempo extractos de células de osteosarcoma de rata que habían sido tratados con VD y comprobaron que no inducían la expresión de STAT5, sugiriendo que la acción no canónica de la familia de RN es amplia, pudiendo modular así las diferentes STATs.







**Figura 12. Asociación de VDR y STAT5 a la matriz nuclear durante la diferenciación ósea de las hMSCs.** Tras una semana de diferenciación, en presencia o no de diferentes hormonas (1 nM VD, 40 nM E y 40 ng/ml P), las células se fijaron y con anticuerpos específicos se estudió la localización de VDR (Alexa 555) y STAT5 (Alexa 488). Las imágenes se realizaron con un aumento del 60x en un microscopio de fluorescencia OLYMPUS IX81 acoplado a una cámara CCD monocroma y color.

#### 4.4.8 En estudios de colocalización de la VD en la regulación de la vía Jak-STAT.

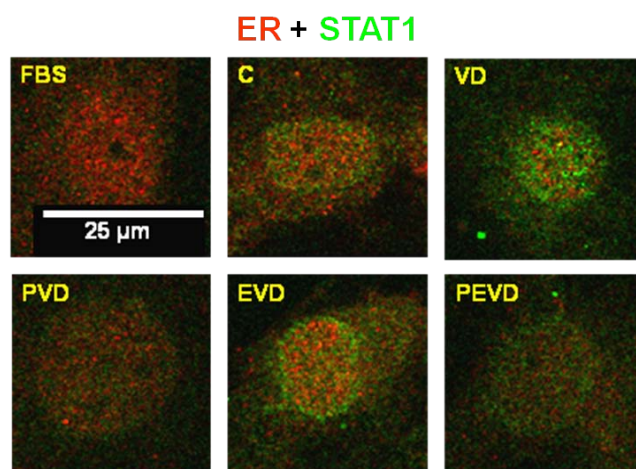
Puesto que con el ensayo anterior sugerimos que la VD parecía no inducir la expresión del factor STAT5, propusimos unos experimentos nuevos de microscopía confocal para poder estudiar en detalle la posible colocalización de las proteínas STATs y ER (*Estrogen Receptor*) en la diferenciación inducida por VD. Estudios previos del laboratorio, en donde se analizaron diferentes STATs, confirmaron que la Dex inhibía la respuesta a E en presencia de STAT5 y ER. Por eso nos preguntamos qué ocurre con ER-STAT, si tratamos a las células con VD más P y E durante una semana de diferenciación. En concreto se

analizaron por inmunocitoquímica los factores de transcripción STAT1, 3 y 5. Los resultados los podemos ver en la Fig. 13. De cada tratamiento se ha seleccionado una foto, un campo y un núcleo representativo. Todas las imágenes se tomaron fijando las mismas condiciones en el microscopio confocal. Los resultados indican de forma general que tanto STAT1 como STAT5 se encuentran en el núcleo de las hMSCs, mientras que STAT3 tiene una localización perinuclear y citoplasmática, ya que se sabe que está implicada en la organización de los microtúbulos (Verma *et al.*, 2009). Con respecto al ER, su localización no cambia con respecto a los diferentes tratamientos, permaneciendo siempre nuclear. Si nos fijamos más detalladamente en cada uno de los apartados podemos observar que: en la Fig. 13A, la VD induce la presencia de STAT1 en el núcleo mientras que los E conducen a cambios en los transcriptomas, ya que la sitúan en la periferia nuclear donde la transcripción es menos activa. También puede apreciarse que la P tiene efecto dominante sobre la VD y los E, lo que nos sugiere un rescate de transcriptomas modulables positiva o negativamente por la acción de la VD sobre STAT1.

Los resultados mostrados en la Fig. 13B indican que todos los factores que estudiamos inducen la presencia de STAT3 en la región perinuclear por vía canónica o no canónica durante la diferenciación osteoblástica. Es importante destacar que los resultados también muestran que ninguno de ellos regula transcriptomas donde ER colocalice con STAT3.

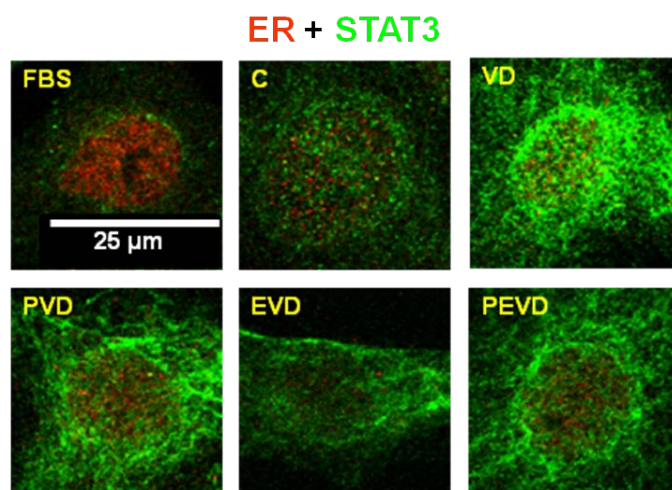
Por último, la Fig. 13C muestra que la VD conduce a la acción reguladora del ER compatible con su entrada en el núcleo y la consiguiente asociación nuclear con STAT5. Este efecto resulta difícil de interpretar y necesita de una investigación posterior. Una de las hipótesis que se barajan, es que podría estar implicada en la salida del ER del núcleo, como se demostró en nuestro laboratorio cuando las células son tratadas con Dex.

A

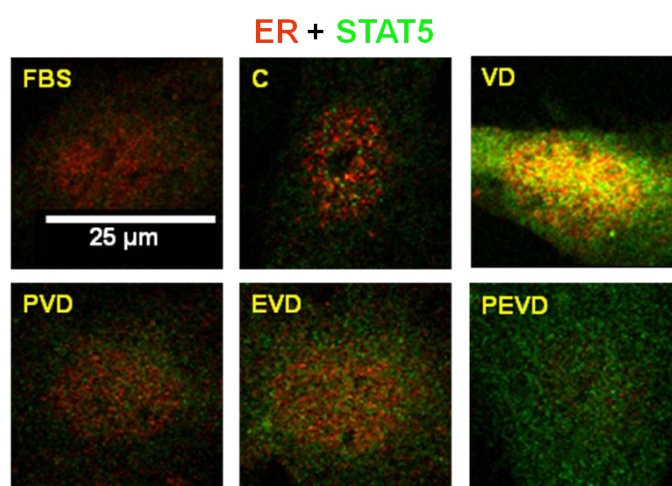




B



C



**Figura 13. Estudio de la posible asociación del ER y las diferentes STATs regulable por VD.** Las células fueron sembradas y diferenciadas en presencia de 1 nM VD, y en algunos casos se añadieron además 40 nM E y/o 40 ng/ml P. A la semana, se fijaron y se analizaron los complejos de diferenciación ósea en los speckles nucleares como se indica en el apartado de *Materiales y Métodos*. Los anticuerpos usados fueron: (A) ER (Alexa 555) y STAT1 (Alexa 488), (B) ER (Alexa 555) y STAT3 (Alexa 488) y (C) ER (Alexa 555) y STAT5 (Alexa 488). Las imágenes se realizaron con un aumento del 60x en un microscopio confocal Espectral Leica TCS SP5.

### **Análisis de la superficie de biomateriales por las hMSCs aisladas de médula ósea.**

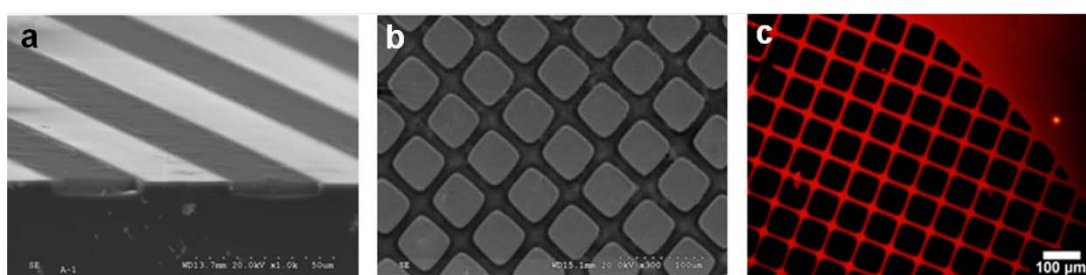
El campo de los biomateriales ha experimentado un espectacular avance en los últimos años y una motivación importante para ello ha sido el hecho de que la esperanza de vida aumente de forma considerable, incrementando la frecuencia de fracturas óseas no auto-regenerables agudizadas por enfermedades degenerativas como la osteoporosis. En este contexto, los biomateriales son utilizados para prótesis (aproximación substitutiva en fracturas críticas y procesos degenerativos agudos) y para la reparación ósea (aproximación regenerativa). Para usarlos como andamios (del inglés, *scaffold*) se impone una caracterización biológica en la que las células mesenquimales se han convertido en una herramienta indispensable de análisis (especialmente, aunque no exclusivamente, para andamios tisulares en terapia celular del cartílago y del hueso). En la actualidad, se ha demostrado por medio de modelos experimentales que las células mesenquimales son capaces de reparar tejidos como hueso, cartílago, tendón y músculo esquelético (Granero-Molto *et al.*, 2008). En vista de que en condiciones *in vitro* se autorrenuevan y proliferan sin perder su capacidad de diferenciarse hacia diferentes linajes, las hMSCs se han convertido en un elemento útil (junto con los biomateriales) para la reparación de lesiones óseas y defectos cartilaginosos. En nuestro caso, se han realizado ensayos de hasta 72 horas, por lo que presentamos un estudio que hace referencia principalmente a la *superficie* de los biomateriales estudiados en presencia de las hMSCs. El análisis en volumen de los materiales supone una degradación gradual de su superficie, lo que implica generalmente un análisis a largo plazo.

### **4.5 Análisis de los cambios morfológicos de las hMSCs sobre las superficies de biomateriales.**

Las células son muy sensibles a las limitaciones geométricas, químicas y mecánicas de su microambiente. Son capaces de reconocer cambios en una superficie y de adaptar con precisión la arquitectura de su citoesqueleto a la geometría de su entorno (Théry, 2010). A continuación exponemos unos ejemplos de diversos materiales en los cuales se estudió la morfología de las hMSCs en función de las distintas propiedades que presentan sus superficies.

#### 4.5.1 Soportes de Silicio/Silicio Poroso (Si/SiP).

Una vez sintetizados los soportes de Si/SiP como se describió en *Materiales y Métodos*, procedimos a su caracterización por medio de SEM y microscopía de Fluorescencia. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Fig. 16. Queda patente que la topografía de la superficie no está alterada en la microescala y que el ataque selectivo en profundidad del Si da lugar a los canales de SiP (Fig. 14a). Los soportes de Si/SiP también se pueden sintetizar en forma de cuadrículas como se puede ver en la Fig. 14b. Un dato de interés es que el SiP tiene una fluorescencia característica cuando se excita con luz ultravioleta (350 nm de longitud de onda). Los resultados muestran que los soportes presentan luminiscencia visible de color rojo (Fig. 14c).



**Figura 14. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM, a y b) y microscopía de fluorescencia (c) mostrando el SiP en diferentes situaciones.** (a) Sección transversal realizada en uno de los patrones de Si alternando con SiP nanoestructurado en forma de raíles. (b) Patrones de Si y SiP con disposición en forma de cuadrados. (c) Fluorescencia característica del área de SiP nanoestructurado (imagen tomada desde arriba). Cortesía de V. Torres Costa y E. Punzón Quijorna.

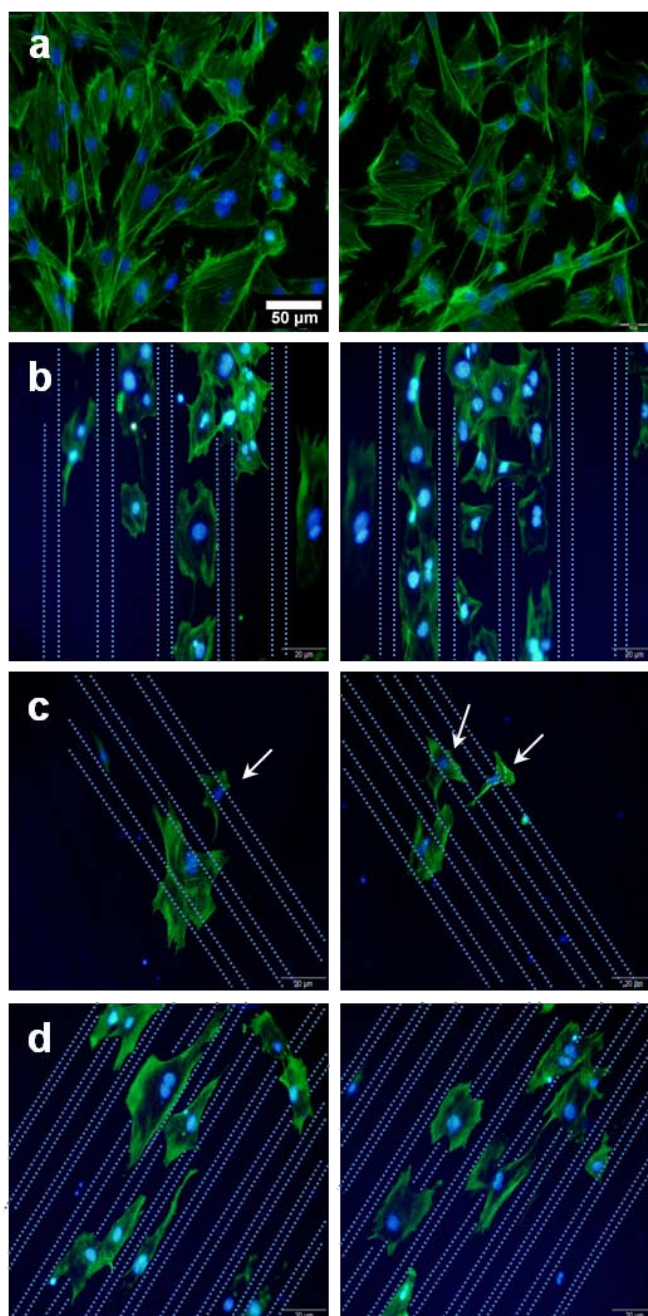
Existen numerosos trabajos que ponen en evidencia el interés del cultivo celular sobre superficies de SiP. En un estudio relevante, se estudió la adhesión de células madre de la pulpa dental (Collard-Dutilleul *et al.*, 2011). La porosidad fue modificada mediante diferentes densidades de corriente (un aumento de corriente da lugar a un aumento de la porosidad) y posteriormente oxidadas o hidroxiladas (lo que determina una química superficial particular). Para determinar la morfología celular y la viabilidad en la superficie, las células se tiñeron con diacetato de fluoresceína (FDA) y se observaron bajo microscopía de fluorescencia. Los resultados mostraron que a 4 y a 24 horas, las muestras porosas e hidroxiladas tendían a ofrecer una mejor adhesión. La tinción de FDA no reveló ninguna diferencia entre el grado de porosidad del SiP pero sí demostró que las células presentaban la misma morfología que en la placa de cultivo.

Nuestro sistema de preparación de muestras permite localizar distintos tipos de silicio sobre la superficie y analizarlos simultáneamente mediante el estudio de la respuesta de adhesión. Como ventaja, los fenómenos de adhesión responden a criterios claros de

selección por las células que evitan/escogen áreas particulares en función de su topografía (grado de porosidad) y composición química (oxidación, hidroxilación).

Por tanto, los patrones de Si/SiP sintetizados fueron usados para ensayos de adhesión y para estudiar el comportamiento de hMSCs durante 72 horas. Una tinción inicial de actina y DAPI nos permitió observar que las hMSCs sobre cristales (control de gelatina) presentan una monocapa casi confluyente típica de células en crecimiento, Fig. 15a. Sin embargo, en las superficies de Si nanoestructurado las hMSCs presentan una polarización de las fibras de actina en la dirección de los raíles (Figs. 15b-d). Aparte de la adaptación a la orientación impuesta por los raíles de Si/SiP, no hay cambios morfológicos particulares con respecto al control de hMSCs y se sigue presentando la forma de fibroblastos.

Un aspecto relevante de estas superficies es que la respuesta de adhesión de las hMSCs depende del ancho de las franjas de Si (para anchuras quasi-constantes de las franjas de SiP) como se puede ver en los estudios de adhesión. Las hMSCs se muestran sensibles a los patrones con dimensiones de 100  $\mu\text{m}$  Si/25  $\mu\text{m}$  SiP, con el citoesqueleto de actina y los núcleos localizados preferentemente en áreas de Si (Fig. 15b). Hay células que aparecen en la etapa final de la división celular, lo que indica preliminarmente un estado de proliferación sobre estas superficies (sobre este aspecto, ver resultados más adelante en el apartado “Estudio de la tasa de proliferación de las hMSCs”). En otras superficies con 50  $\mu\text{m}$  Si/25  $\mu\text{m}$  SiP, las hMSCs se localizan preferentemente sobre el Si, pero en ocasiones sobre el SiP (Fig. 15c). En la última configuración estudiada, al reducir la anchura del Si a 40  $\mu\text{m}$  Si/20  $\mu\text{m}$  SiP, los cambios de adhesión de las hMSCs son notables (Fig. 15d). El citoesqueleto de actina se mantiene en el Si como en el caso anterior, pero los núcleos de las células se colocan sobre el SiP y además se presentan algo polarizados, lo que hace pensar en una configuración de migración. Merece la pena señalar que la orientación de las fibras de actina de las hMSCs sobre los patrones de Si/SiP no es al azar. En general, las fuerzas uniaxiales ejercidas a través de las fibras de actina predominantemente polarizadas en la dirección del desplazamiento son la forma más eficiente para la migración. Por tanto, podemos decir que las respuestas de adhesión dependen de las dimensiones de los raíles. De los tres casos de superficies estudiados, el de 40  $\mu\text{m}$  Si/20  $\mu\text{m}$  SiP es el más destacado por la particularidad de la adhesión celular observada.



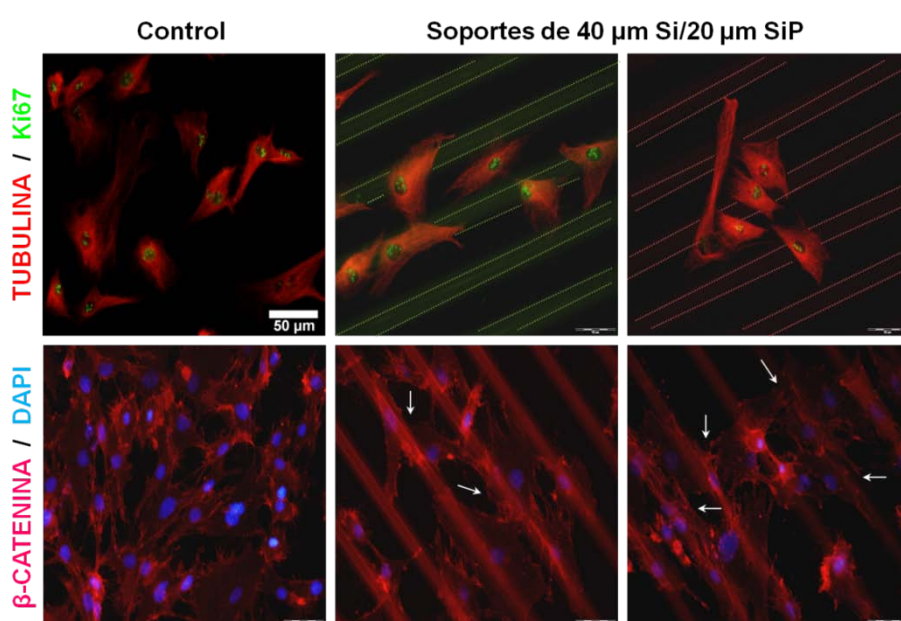
**Figura 15. Imágenes de microscopía de fluorescencia de hMSCs sobre soportes de Si/SiP.** Las células se sembraron sobre los soportes durante 72 horas y posteriormente se realizó una inmunocitoquímica con Ph488 para visualizar la actina. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. (a) Control positivo de proliferación. (b) Soportes de 100  $\mu\text{m}$  Si/25  $\mu\text{m}$  SiP. (c) Soportes de 50  $\mu\text{m}$  Si/25  $\mu\text{m}$  SiP. (d) Soportes de 40  $\mu\text{m}$  Si/20  $\mu\text{m}$  SiP. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo del 40x en un microscopio invertido de fluorescencia OLYMPUS IX81 acoplado a una cámara CCD monocroma y color.

Con el fin de obtener una vinculación directa entre el citoesqueleto y los núcleos, se estudiaron una serie de muestras nuevas de 40  $\mu\text{m}$  Si/20  $\mu\text{m}$  SiP mediante la tinción de tubulina y  $\beta$ -catenina (Fig. 16). Podemos ver en los resultados, que la morfología general de



la tubulina no difiere mucho de la observada en los controles. Es evidente sin embargo, que la tubulina se ve afectada por el proceso de polarización general y que los microtúbulos siguen la orientación de los raíles. Por otro lado, la  $\beta$ -catenina es una proteína estructural que forma parte de las uniones entre células y quisimos estudiar su disposición a lo largo de la rejilla. Las hMSCs cultivadas sobre el control de gelatina presentan gran número de uniones celulares. Esto es debido a la gran extensión de superficie que ocupan, como ocurre con la actina, pero este comportamiento sobre 40  $\mu$ m Si/20  $\mu$ m SiP parece alterado, y la  $\beta$ -catenina parece preferir al SiP (Fig. 16).

Hay que señalar que la caracterización de los soportes de Si/SiP continúa en la sección 4.8.2 con la descripción de los estudios de proliferación de las hMSCs.

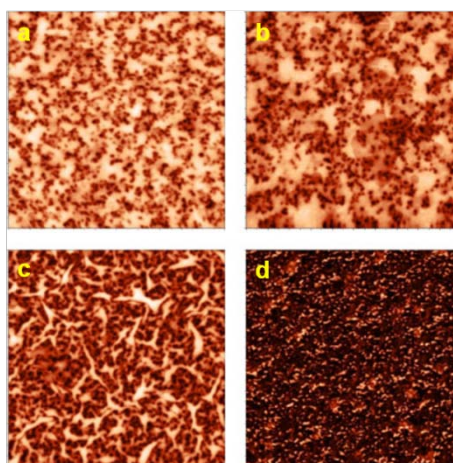


**Figura 16. Imágenes de microscopía de fluorescencia de hMSCs sobre soportes de 40  $\mu$ m Si/20  $\mu$ m SiP.** Las células fueron sembradas sobre los soportes durante 72 horas y posteriormente teñidas con  $\beta$ -tubulina, Ki67,  $\beta$ -catenina y DAPI. Se muestran controles positivos de proliferación. Las fotografías fueron realizadas con un microscopio invertido de fluorescencia OLYMPUS IX81 acoplado a una cámara CCD monocroma y color y con un objetivo del 40x.

### 4.5.2 Soportes de polietilenglicol-polietilenglicol diacrilato con nanopartículas de titanio (PEG-PEGd-Ti).

Se prepararon los soportes de PEG-PEGd-Ti y se utilizó el microscopio de fuerzas atómicas (AFM) para revelar la estructura de las películas (Fig. 17). Estas imágenes corresponden al control y a los soportes expuestos a UV. Como puede verse en la Fig. 17a, los soportes control muestran una distribución de nanopartículas dispersa dentro de un fondo de rugosidad relativamente alto. El tamaño de las nanopartículas está acotado, aunque no

sea monodisperso, presentando un tamaño medio de diámetro de  $14 \pm 7$  nm. Esta estructura/tamaño evoluciona como una función creciente en el tiempo de exposición a la radiación de 365 nm. De hecho, las nanopartículas tienden a unirse, formando agregados de partículas incrementando el diámetro ( $19 \pm 7$  nm y  $22 \pm 7$  nm, durante 2 y 4 minutos de exposición a UV, Figs. 17b y c, respectivamente) hasta que la agregación hace imposible definir la nanoestructura de la capa híbrida (10 minutos de exposición a UV, Fig. 17d).



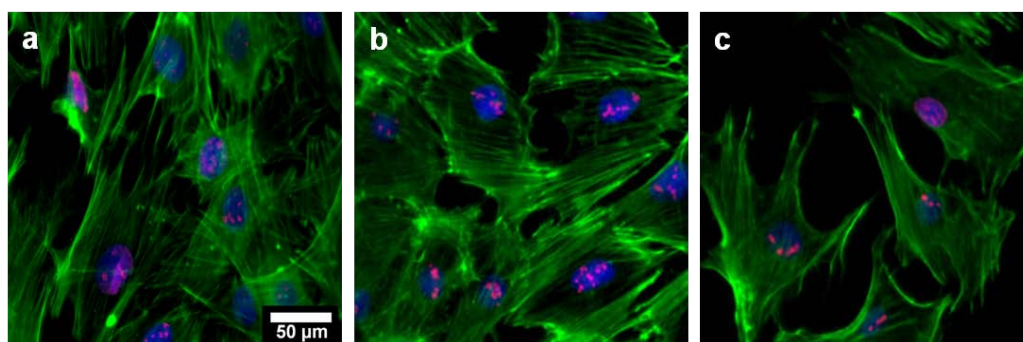
**Figura 17. Imágenes de microscopía de fuerzas atómicas (AFM) ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ) de capas de PEG-PEGd-Ti, mostrando las nanopartículas de titanio antes (a) y después de la exposición a luz UV a 365 nm durante 2 (b), 4 (c) y 10 minutos (d). Cortesía de M.J. Pérez Roldán.**

En nuestro estudio, las hMSCs son capaces de diferenciar entre las superficies de PEG-PEGd-Ti que fueron expuestas a un determinado tratamiento (radiación UV) y las que no, como muestran los estudios de adhesión y de morfología. Podemos sugerir que tanto la composición del andamio, como los cambios que sufre su superficie, son claramente determinantes del comportamiento celular.

La biocompatibilidad de los soportes de PEG-PEGd-Ti fue ensayada cultivando durante 72 horas las hMSCs, llevando en paralelo el control positivo de crecimiento (Fig. 18a). Las hMSCs se adhieren bien sobre los soportes, formando una capa confluyente como en el control de gelatina. Los filamentos de actina presentan una estructura paralela definiendo una forma poligonal de las células con el núcleo ocupando la posición central (Fig. 18b). El comportamiento de las hMSCs cambia cuando se siembran sobre soportes de PEG-PEGd-Ti previamente expuestos a luz UV (4 minutos, 365 nm). El número de células adheridas disminuye considerablemente como se puede observar en la Fig. 18c. Los filamentos de actina no presentan una estructura de fibras de estrés tan definida. Adicionalmente, la morfología celular parece más estriada y los núcleos excéntricos. En comparación con el

comportamiento de hMSCs sobre gelatina, los soportes no tratados con UV muestran una densidad celular similar. Sin embargo, el aspecto respecto a la distribución de los filamentos de actina y el menor número de las adhesiones focales se acerca mas a las muestras tratadas. Por tanto los resultados muestran que las hMSCs son capaces de “sentir” (Buxboim *et al.*, 2010) las diferencias entre los soportes de PEG-PEGd-Ti que fueron expuestos a luz UV como muestra la disminución del número de células adheridas y los cambios morfológicos que sufren.

En la sección 4.8.3 se estudia la tasa de proliferación de las hMSCs sobre estos soportes de PEG-PEGd-Ti.



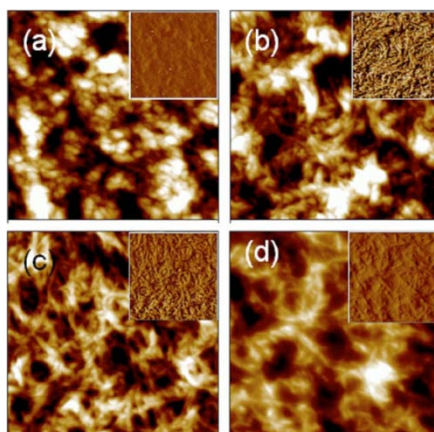
**Figura 18.** Imágenes de microscopía de fluorescencia mostrando el citoesqueleto de actina, los núcleos y la proliferación celular de las hMSCs durante 72 horas sobre, (a) cristales con gelatina (control de crecimiento), (b) soportes PEG-PEGd-Ti y (c) soportes después de 4 minutos de exposición con luz UV a 365 nm. Las fotografías fueron tomadas con un aumento del 40x en un microscopio invertido de fluorescencia OLYMPUS IX81 acoplado a una cámara CCD monocroma y color.

### 4.5.3 Hidrogeles híbridos de agarosa-3-aminopropiltietoxisilano (APTS).

Las superficies de los hidrogeles híbridos fueron secadas a temperatura ambiente y estudiadas mediante el uso del AFM, con el fin de obtener una visión de la superficie micro-nanoestructurada. En la Fig. 19 se muestran los resultados de las imágenes de topografía tanto de la agarosa como de las muestras de agarosa con concentraciones crecientes de APTS (5, 10 y 20 %). Como se puede analizar, todas las muestras presentan superficies irregulares con varios puntos ciegos, sugiriendo la presencia de una estructura nanoporosa. Se puede observar un cambio morfológico gradual, ya que se pasa de un entorno de nanoesferas aglomeradas, como se perciben para hidrogeles que no contenían APTS (Fig. 19a), hacia una malla de filamentos dendríticos observados para los hidrogeles ricos en APTS (Fig. 19d especialmente). Esta tendencia hacia una morfología filamentosa es también claramente visible en las imágenes AFM en contraste de fases (inserciones, Fig. 19a-d).



Además, la anchura de las estructuras filamentosas formadas se reduce al incrementar el contenido de APTS. Esto refleja la capacidad del APTS para comprimir el hidrogel durante el secado. Es conveniente recordar que el APTS presenta una tendencia a la formación de nanocoloides en soluciones de agua, especialmente por reacciones de condensación durante el secado (Leïché *et al.*, 2005; Manso-Silván *et al.*, 2009).



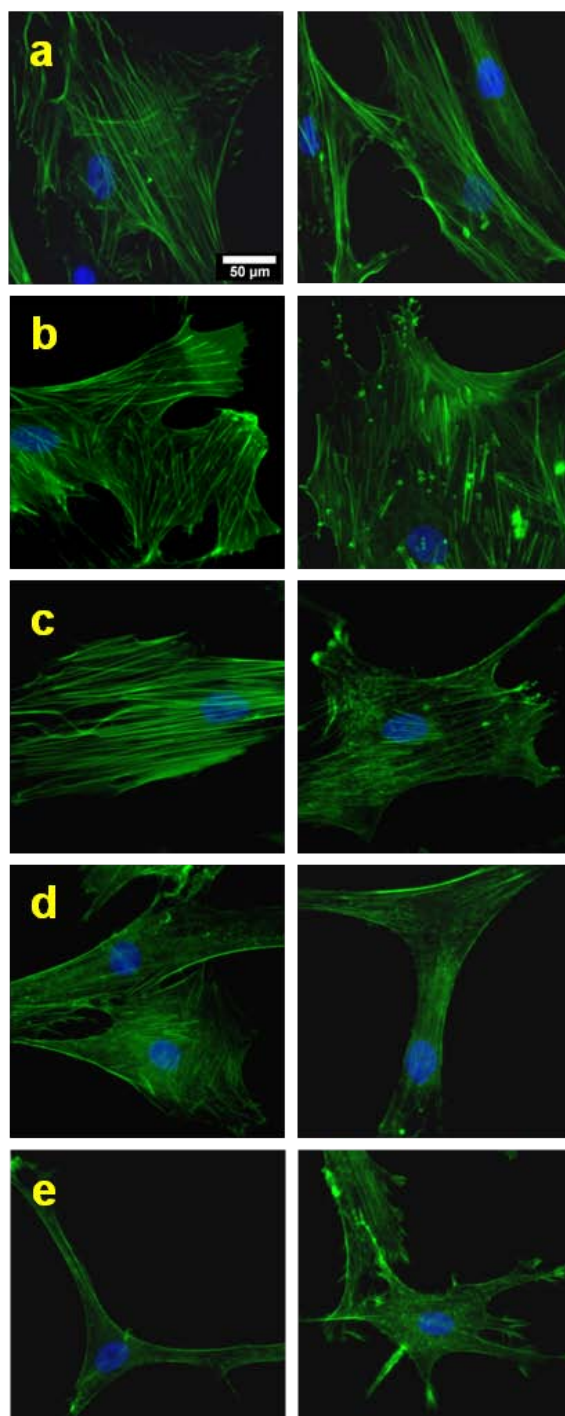
**Figura 19. Imágenes AFM de topografía (campo dominante) y contraste de fases (inserciones) ( $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ ) de las superficies desecadas de hidrogeles de agarosa al 100% (a), de agarosa + 5% APTS (b), de agarosa + 10% APTS (c) y de agarosa + 20% APTS (d). Cortesía de C. Satriano.**

Existen múltiples ejemplos de hidrogeles para usar en ingeniería de tejidos, como el de agarosa-gelatina (Sakai *et al.*, 2007). En dicho trabajo sintetizaron un conjugado, donde la gelatina fue covalentemente unida a la agarosa por medio de 1,1-carbonildiimidazol. Sembraron células renales felinas sobre este conjugado y por medio de microscopía óptica estudiaron la morfología celular. Las células se adhirieron y extendieron a las 4 horas de cultivo en concordancia con los controles (placas de cultivo que presentaron el mismo número de células adheridas). Comprobaron la adhesión sobre hidrogeles creados a partir de agarosa y gelatina pero sin acople covalente, y determinaron que las células se adherían pero no se expandían, ni a 4 ni a 24 horas. Por tanto, se pudo concluir que el conjugado era efectivo para aumentar la adhesión celular.

Estos resultados sugieren que para nuestros hidrogeles de agarosa, las células van a ser capaces de diferenciar las concentraciones variables de APTS. Los estudios de adhesión y de morfología sirven como criterio de selección, ya que las hMSCs eligen sobre qué superficie adoptar una mayor extensión celular dependiendo del contenido del hidrogel.

Para el análisis de la adhesión, las hMSCs fueron sembradas en MC durante 72 horas sobre la superficie de gelatina (control de crecimiento), de agarosa y los hidrogeles híbridos

agarosa-APTS. El análisis se realizó mediante inmunocitoquímica y microscopía de fluorescencia. Los resultados de adhesión y de morfología se presentan en la Fig. 20.



**Figura 20. Imágenes de microscopía de fluorescencia de las hMSCs sobre los andamios híbridos de agarosa-APTS.** Inmunocitoquímica con Ph488 (actina). Los núcleos se visualizaron con DAPI. En las diferentes fotografías se muestra cómo afecta el aumento del contenido de APTS: control de gelatina (a), agarosa sin APTS (b), agarosa + 5% APTS (c), agarosa + 10% APTS (d) y agarosa + 20% APTS (e). Las fotografías fueron realizadas con un aumento del 60x en un microscopio invertido de fluorescencia OLYMPUS IX81 acoplado a una cámara CCD monocroma y color.

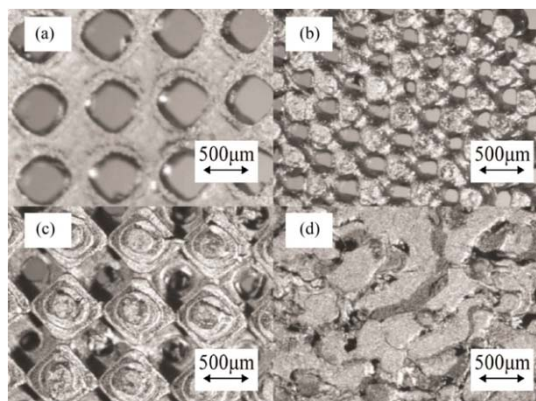
Las superficies control de agarosa inducen una gran adhesión de hMSCs que se extienden ocupando áreas más grandes (Fig. 22b,  $1800 \pm 400 \mu\text{m}^2$ ) que las células cultivadas sobre los hidrogeles híbridos (Figs. 20c-e,  $1200 \pm 300$ ,  $650 \pm 100$  y  $360 \pm 70 \mu\text{m}^2$  para 5, 10 y 20 % de APTS, respectivamente). Según aumenta el contenido de APTS en los materiales híbridos, el área de superficie ocupada por las células disminuye notablemente pero la capacidad de formar filopodios aumenta dramáticamente (Figs. 20c y d). De hecho, en el híbrido con mayor concentración de APTS, las hMSCs muestran formas estriadas características de la actina que recuerda a las estructuras dendríticas así como adhesiones focales excéntricas. Por tanto, podemos concluir que incrementando la concentración de APTS, se induce una disminución en la tasa de células adheridas, pero se aumenta el número de filopodios.

Es de señalar, que el análisis de los hidrogeles agarosa-APTS continúa en la sección 4.8.1 con el estudio de la tasa de proliferación de las hMSCs.

#### **4.5.4 Andamios de resina epoxi recubiertos con Diamond Like Carbon (DLC).**

Con este tipo de materiales quisimos analizar la influencia en la adhesión de las hMSCs en diferentes tamaños calibrados de poro y la morfología de las superficies. Estudios anteriores que tienen en cuenta tamaños de poro que varían entre 350 y 650  $\mu\text{m}$  ya ponen de manifiesto efectos en la capacidad de adhesión celular (Roosa *et al.*, 2010). Esta investigación, que hace referencia a tamaños de poro en un rango similar al utilizado en nuestro estudio, declara un papel limitado de este parámetro en la regeneración de los tejidos. Se propone como alternativa más eficiente el control de la forma y las propiedades químicas de la superficie.

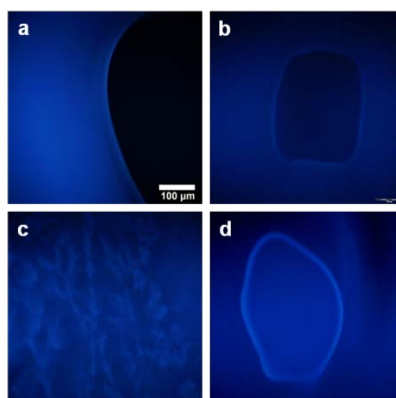
Se estudiaron cuatro modelos diferentes de sustrato: dos planos 2D (Diseños A y B) y dos andamios 3D, con superficie regular (Diseño C) o irregular/fractal (Diseño D). Los tamaños de poro fueron comparados a dos niveles, los diseños A y C tenían poros más grandes que los diseños B y D. La Fig. 21 incluye imágenes detalladas de microscopía óptica del prototipado rápido de los andamios 2D y 3D, de acuerdo con los cuatro diseños diferentes explicados.



**Figura 21. Detalle de las imágenes de microscopía óptica de los diferentes diseños de prototipado rápido de los andamios de resina epoxi con recubrimientos DLC.** (a) Diseño A, andamio 2D con poros de 650  $\mu\text{m}$  de diámetro. (b) Diseño B, andamio 2D con poros de 350  $\mu\text{m}$  de diámetro. (c) Diseño C, andamio 3D con superficie regular y con poros de 650  $\mu\text{m}$  de diámetro y (d) Diseño D, andamio 3D con superficie irregular o fractal y con poros de 350  $\mu\text{m}$  de diámetro. Cortesía de A. Díaz Lantada.

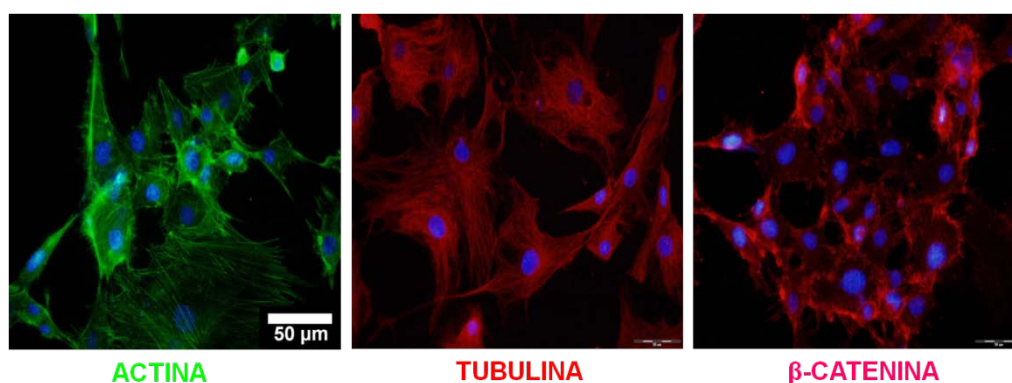
Los andamios control sin recubrimiento DLC (Fig. 22) sobre los que no se observaron células adheridas, manifiestan la necesidad de un recubrimiento para mejorar la interacción célula-andamio. Otros cuatro prototipos fueron recubiertos con DLC que es altamente biocompatible y promueve la adhesión celular, como se pudo comprobar en el estudio de Chai *et al.*, 2008. En dicho trabajo prepararon substratos de silicio recubiertos con DLC a partir de: metano, metano deuterado y mezcla de ambos. Los tratamientos se realizaron bajo dos voltajes: -400 y -600 V. Los estudios de adhesión se llevaron a cabo sembrando osteoblastos sobre Si-DLC durante tres días. La morfología celular se evaluó mediante SEM. Las imágenes confirmaron que el comportamiento óptimo de adhesión, entre todas las superficies tratadas, se producía en las superficies 600-metano y 600-metano deuterado. Mostraban un incremento de filopodios y microvellosidades para favorecer el intercambio entre el medio y la célula. Por tanto, el recubrimiento de DLC sobre el silicio producía mejor estabilidad de la superficie y mejoraba las respuestas celulares.

En nuestros andamios de resina con recubrimiento DLC, tanto la morfología de la superficie (2D o 3D) como el grado de porosidad, son factores indispensables para estudiar la respuesta celular. Los estudios de adhesión nos permiten observar cómo las hMSCs se sitúan en determinadas áreas del andamio, favoreciendo así el intercambio medio-célula y permitiendo la regeneración de los tejidos.



**Figura 22.** Imágenes de microscopía de fluorescencia de los andamios de prototipado rápido sin recubrimiento DLC en los cuales no se aprecian células adheridas. (a) Diseño A, (b) Diseño B, (c) Diseño C y (d) Diseño D. Las fotografías se realizaron con un aumento del 20x en un microscopio invertido de fluorescencia OLYMPUS IX81 acoplado a una cámara CCD monocroma y color.

En nuestro estudio, se analizó la adhesión de las hMSCs durante 72 horas en presencia de MC y se comparó con controles positivos de gelatina (Fig. 23). Como se puede observar en la Figura 23, se muestran las hMSCs crecidas sobre superficies de gelatina. En ellas se estudian diferentes proteínas que participan en la integridad del citoesqueleto y que van a determinar la forma y el tamaño de las células, como sugieren las proteínas de actina y de tubulina. Al ser una compleja red tridimensional, favorece la interacción de unas células con otras, como muestra la  $\beta$ -catenina.



**Figura 23.** Imágenes de microscopía de fluorescencia de los controles de gelatina. Las hMSCs se fijaron para realizar una inmunocitoquímica y estudiar la actina, tubulina  $\beta$  y  $\beta$ -catenina. Las fotografías se realizaron con un aumento del 40x en un microscopio invertido de fluorescencia OLYMPUS IX81 acoplado a una cámara CCD monocroma y color.

Las hMSCs fueron fijadas sobre estos andamios recubiertos con DLC y analizadas por inmunocitoquímica con actina, tubulina  $\beta$   $\beta$ -catenina para observar cómo se encontraba el

citoesqueleto. Los resultados se muestran en la Fig. 24. En términos generales, los poros de mayor diámetro (650  $\mu\text{m}$ ) permiten el acceso de nutrientes a las células y tienden a promover la tasa de crecimiento, obteniendo así agregaciones más compactas. Los resultados también muestran que la forma de los andamios y la morfología de las superficies desempeñan un papel más relevante que el tamaño del poro en la determinación de la adhesión. Veamos en detalle lo que ocurre en cada modelo:

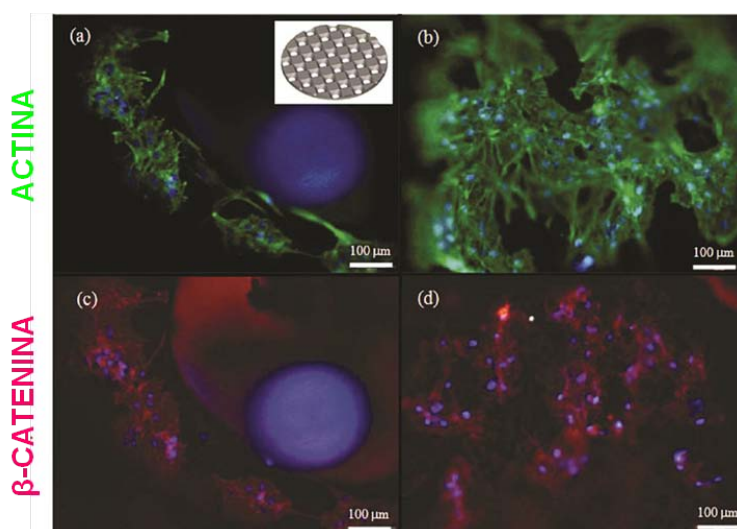
### - Diseño A: andamio 2D con poros de 650 $\mu\text{m}$ de diámetro.

La Fig. 24A muestra diferentes imágenes de células que fueron sembradas sobre esta estructura con unas zonas planas y otras de grandes poros. En este diseño, las células forman haces lineales debido a que rodean los poros del andamio, y progresivamente, van creando una estructura en red. Las imágenes muestran una clara interacción célula-célula formando micromasas, demostrando ser compatibles con los cultivos ligados al desarrollo del cartílago (Yoo *et al.*, 1998).

### -Diseño B: andamio 2D con poros de 350 $\mu\text{m}$ de diámetro.

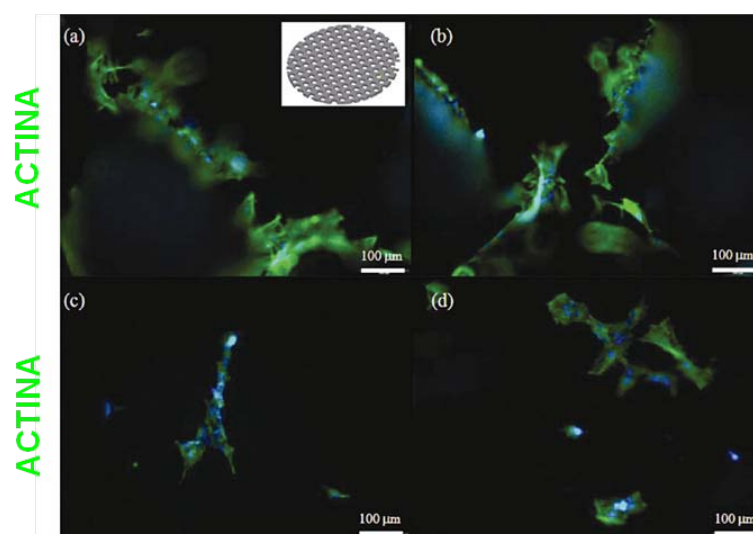
Las células parecen percibir el alineamiento regular de los poros de menor diámetro como si formaran un camino (Fig. 24B). Por lo tanto, se promueve un notable crecimiento lineal, como ya se había informado en estudios relacionados con la litografía para el cultivo celular (Li *et al.*, 2003). Las posibles aplicaciones de estas superficies van desde la investigación sobre motilidad celular hasta el control del crecimiento celular lineal para el desarrollo de circuitos biológicos, usando andamios 1D (Doyle *et al.*, 2009).

A





B



**Figura 24 A y B. Imágenes de microscopía de fluorescencia validando el crecimiento celular de las hMSCs sobre los andamios de prototipado rápido recubiertos con DLC.** (A) Diseño A con Ph488 y DAPI (a y b) y  $\beta$ -catenina y DAPI (c y d), (B) Diseño B con Ph488 y DAPI (a-d). Las fotografías fueron realizadas en un microscopio invertido de fluorescencia OLYMPUS IX81 acoplado a una cámara CCD monocroma y color con un aumento del 20x.

Los diseños C y D al ser andamios con estructuras en volumen, han sido incluidos en el apartado siguiente reservado a las estructuras 3D.

#### 4.6 Aproximación a los cultivos 3D con hMSCs.

En la medicina regenerativa y la ingeniería tisular, cultivar células sobre andamios tridimensionales constituye un paso imprescindible en la regeneración *in vitro* de tejidos u órganos como hueso y cartílago entre otros. Realizamos unos ensayos con andamios porosos aproximándonos a los cultivos tridimensionales (Haycock, 2011). De esta manera las células crecen en el interior simulando al tejido vivo, encontrándose en un entorno idealmente “más natural” que las cultivadas en 2D. Veamos algunos ejemplos.

##### 4.6.1 Andamios 3D recubiertos con DLC:

- Diseño C: andamio con superficie regular y 650  $\mu$ m de diámetro de poro.

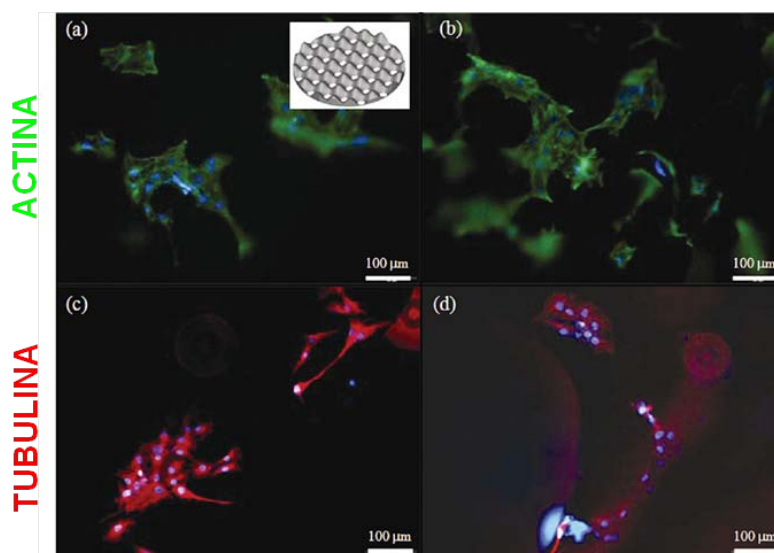
La Fig. 24C muestra diferentes imágenes de células sobre este tipo de andamio, que parece limitar la motilidad celular y promueve un crecimiento compacto localizado, en los valles de la

microestructura. Se forman así agregaciones esféricas con posibles aplicaciones, como promover la diferenciación en osteocitos para la reparación ósea. Sin embargo, en las regiones donde las células no se adhieren, se limita consecuentemente el crecimiento celular, lo que ilustra las dificultades relacionadas con el diseño de andamios para la regeneración del hueso. Además de los diferentes resultados obtenidos usando andamios 2D y 3D, estos muestran claramente que las “células sienten la diferencia” entre soportes blandos y rígidos, de acuerdo con los resultados de investigaciones recientes (Buxboim *et al.*, 2010).

### - Diseño D: andamio con superficie irregular o fractal y 350 $\mu\text{m}$ de diámetro de poro.

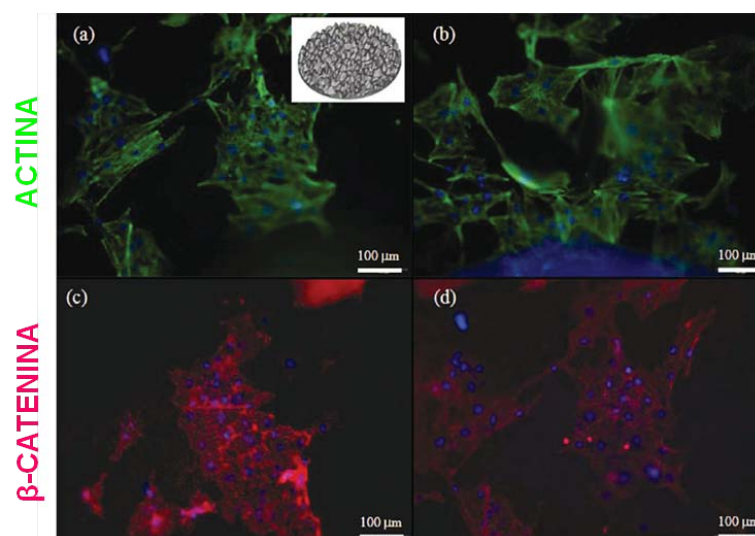
Según los resultados mostrados en la Fig. 24D, se promueve un crecimiento al azar y más extendido, con potencial para aplicar la diferenciación hacia la mejora de los tejidos blandos. Debido a la presencia de poros de menor diámetro y a las irregularidades, las hMSCs tienden a propagarse más fácilmente lo que parece inducir el crecimiento en todas las direcciones. Las características irregulares del andamio, la presencia de bordes y una relación más estrecha entre la superficie expuesta del andamio y el tamaño, promueven la adhesión celular. Creemos que este diseño va en la buena dirección y será objeto de futuros estudios en el campo de la ingeniería de tejidos.

C





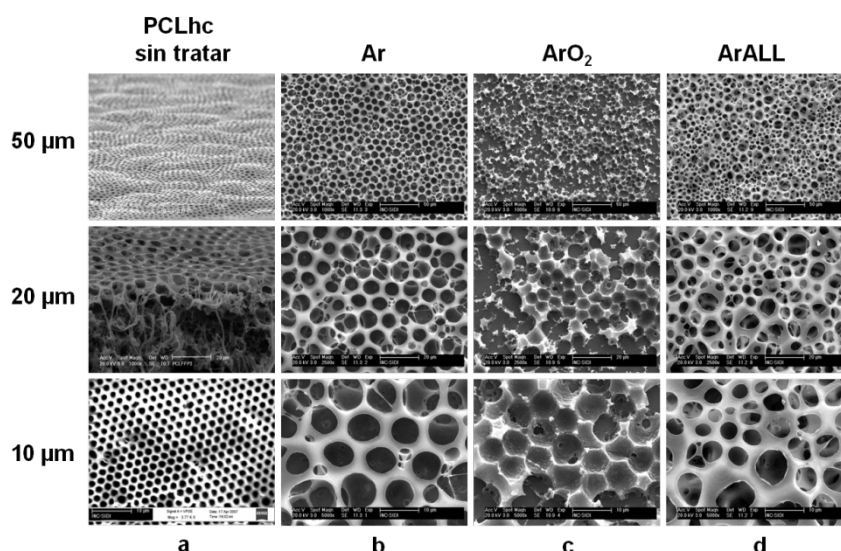
D



**Figura 24 C y D. Imágenes de microscopía de fluorescencia validando el crecimiento celular de las hMSCs sobre los andamios de prototipado rápido recubiertos con DLC.** (C) Diseño C con Ph488 y DAPI (a y b) y  $\beta$ -tubulina y DAPI (c y d) y (D) Diseño D con Ph488 y DAPI (a y b)  $\beta$ -catenina y DAPI (c y d). Las fotografías fueron realizadas en un microscopio invertido de fluorescencia OLYMPUS IX81 acoplado a una cámara CCD monocroma y color con un aumento del 20x.

#### 4.6.2 Andamios de policaprolactona con estructura honeycomb (PCLhc).

En primer lugar se prepararon modelos de PCLhc, como podemos observar en la Fig. 25. Estos andamios fueron diseñados con diversas modificaciones a micro-escala inducidas por el tratamiento de descarga plasma a las estructuras de PCLhc (ver detalles experimentales en la sección 3.5.1.1). El microscopio electrónico de barrido (SEM) fue seleccionado como la herramienta para analizarlas. Todos los andamios fueron producidos en idénticas condiciones, con una uniformidad de grosor excepcional como puede verse en el andamio de PCLhc sin modificar (Fig. 25a). Las superficies presentan una distribución de poros con tamaño medio de 6  $\mu\text{m}$  y se caracterizan por la monodispersión.



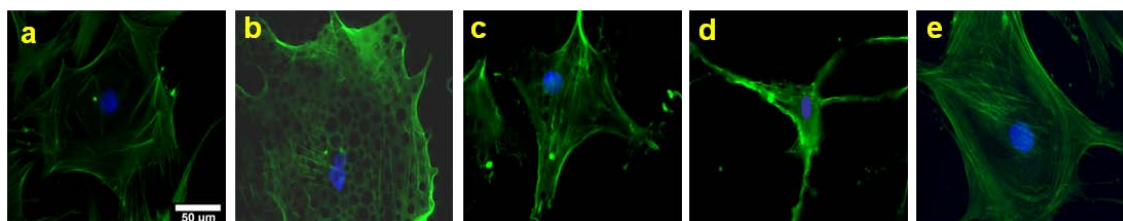
**Figura 25. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) mostrando la morfología de las superficies de PCLhc.** Se muestra una vista general y detallada de los andamios PCLhc sin modificar (a) y los modificados con Ar (b),  $\text{ArO}_2$  (c) y ALL (d). Cortesía de F. Formosa.

Son múltiples los trabajos en los cuales se tratan las superficies de biomateriales con diferentes recubrimientos para mejorar sus propiedades. En el caso de la PCL, los andamios han sido recubiertos previamente con colágeno tipo I y sulfatos de condroitina (Rentsch *et al.*, 2010). Este estudio demostró que la estructura porosa del andamio de PCL en conjunción con el recubrimiento, permitía adherirse a las células madre aisladas de médula ósea ovina. Dichas células presentaban características similares a los fibroblastos. Las células desarrollaban podios en 24 horas de cultivo, que unían unas células con otras y penetraban en el plano 3D del andamio para migrar, lo que representa un relevante ejemplo de funcionalización 3D.

En nuestro caso, los andamios preparados de PCLhc presentan modificaciones en sus superficies debido al tratamiento con diversas descargas de plasma. Esto permite que las hMSCs respondan de una manera específica como demuestran los ensayos de adhesión y de morfología celular. Dependiendo de la funcionalización realizada sobre la superficie del andamio, las células responden con un comportamiento diferente.

Nos preguntamos por la respuesta de las hMSCs sobre la PCLhc, y sobre todo, por la capacidad de sentir las diferentes funcionalizaciones de las superficies. Se realizaron un total de 3 experimentos, que se presentan de forma resumida en la Fig. 26. Se observa que las hMSCs adheridas a las superficies de gelatina al 0,5% (control de crecimiento, Fig. 26a) lo hacen de la misma manera que sobre la superficie PCLhc (Fig. 26b). Después de 24 horas de cultivo en presencia de MC, las hMSCs fueron teñidas con Ph488 para estudiar los filamentos

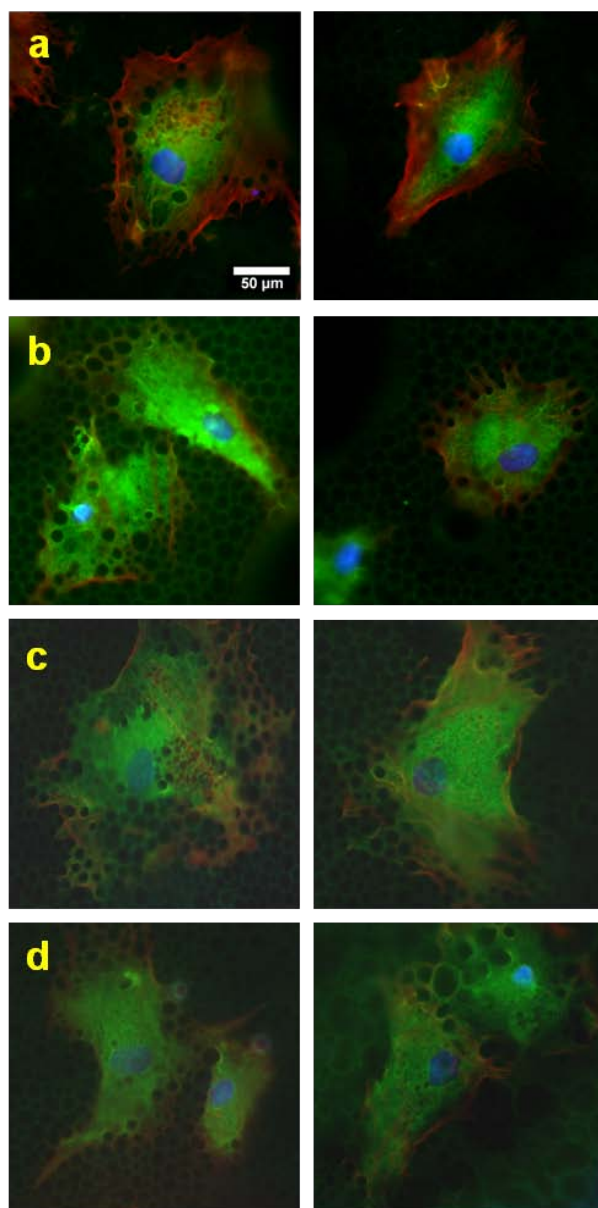
de actina y con DAPI para visualizar los núcleos. Las células control muestran una morfología fibroblástica con los filamentos de actina y una organización del citoesqueleto que fue descrita en células proliferando (Romero-Prado *et al.*, 2006). Por tanto, las hMSCs sobre PCLhc presentan un citoplasma extendido con numerosas adhesiones focales como las observadas en células MSCs diferenciadas a hueso (Mathieu *et al.*, 2012). Cuando las hMSCs se siembran sobre los andamios de PCLhc modificados, se observa que se adaptan a todos los tipos de superficies, aunque se detectan grandes diferencias en la estructura de la adhesión celular de un tipo de superficie a otro. Las células en PCLhcAr (Fig. 26c) están extendidas y polarizadas en la superficie. Para PCLhcArO<sub>2</sub> (Fig. 26d), las células muestran el citoplasma retraído con adhesiones focales visibles, aunque queda patente una muy drástica inhibición de la extensión de la actina. Por tanto, podemos sugerir que los radicales libres en la superficie pueden ser los responsables de la adhesión celular y de la retracción del citoplasma. Resulta interesante observar que el cultivo celular sobre la superficie de PCLhcALL (Fig. 26e), induce una considerable extensión de las hMSCs reproduciendo los perfiles de adhesión de las células sobre los controles de gelatina. Se observa que las hMSCs se adhieren a las superficies por numerosas adhesiones focales y muestran considerables extensiones de filamentos de actina. Sin embargo, la polarización de las hMSCs es diferente de una muestra a otra, con formas particularmente polarizadas para las muestras no oxidadas. De estos estudios podemos sugerir que las hMSCs son capaces de reconocer las diferencias entre las superficies modificadas y que el andamio PCLhcALL es un material micro y nano estructurado muy atractivo para ellas.



**Figura 26. Comportamiento de las hMSCs sobre las superficies de PCLhc con o sin modificar.** Las células fueron cultivadas durante 24 horas en MC, fijadas y analizadas por inmunocitoquímica con Ph488 (para visualizar actina) y DAPI (para teñir los núcleos de las células). Se representan imágenes de los controles positivos de proliferación sobre superficies de gelatina al 0,5% (a), PCLhc sin modificar (b), PCLhcAr (c), PCLhcArO<sub>2</sub> (d) y PCLhcALL (e). Las fotografías fueron realizadas con un aumento del 60x en un microscopio invertido de fluorescencia OLYMPUS IX81 acoplado a una cámara CCD monocroma y color.

Realizamos un ensayo en el cual el modelo de diferenciación de hueso fue probado sobre esta última superficie en particular, añadiendo al medio de cultivo VD como factor de diferenciación. Después de 4 horas de cultivo, las células fueron fijadas y analizadas por

inmunocitoquímica con el suero de ratones transgénicos para la hormona de crecimiento (Ogueta *et al.*, 2000). Los resultados se muestran en la Fig. 27.



**Figura 27. Imágenes de microscopía de fluorescencia de hMSCs sobre PCLhcALL.** Las células fueron crecidas durante 4 horas en MC y en ausencia (a) o no de concentraciones crecientes de VD, (b) 1 nM, (c) 1  $\mu$ M y (d) 10  $\mu$ M. Se realizó una inmunocitoquímica con el suero de ratones transgénicos para la hormona de crecimiento, usando Alexa 488 y Alexa 594 para detectar el citoesqueleto de las células. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las fotografías fueron realizadas con un aumento del 60x en un microscopio invertido de fluorescencia OLYMPUS IX81 acoplado a una cámara CCD monocroma y color.

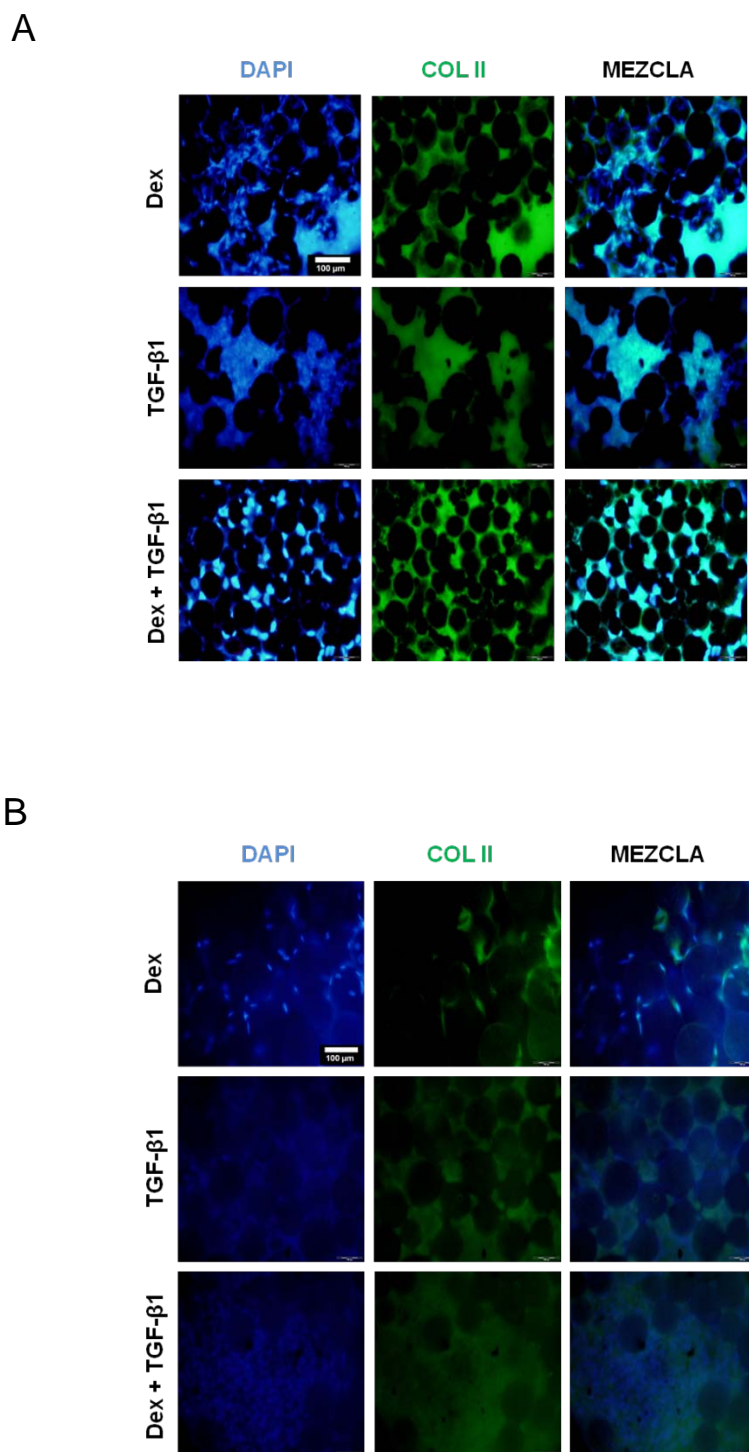
Podemos ver como sin VD en el cultivo (Fig. 27a), los patrones de adhesión son compatibles con los observados en los ensayos iniciales que mostraban la estructura de la actina bien desarrollada y los filamentos intermedios con secretomas. Cuando la VD es añadida en

concentraciones crecientes al medio de cultivo (Figs. 27b-d), las hMSCs presentan poca señal de actina pero los filamentos intermedios aparecen muy extendidos ocupando grandes superficies del material. La presencia de vesículas fue confirmada en todas las muestras indiferentemente de la concentración de VD añadida. Estos resultados sugieren que PCLhcALL es más favorable que PCLhcAr y PCLhcArO<sub>2</sub>. PCLhcALL posee propiedades adecuadas para la interacción como muestran las hMSCs sembradas sobre su superficie. Además, tienen una morfología similar a los controles de proliferación.

#### **4.7 Estudios de condrogénesis de hMSCs con microesferas.**

Pocos son los estudios que hacen referencia a la condrogénesis llevada a cabo con microesferas de material. Uno de ellos es el de microesferas de alginato (Kamishina *et al.*, 2006), donde se realizaron cultivos tridimensionales con condrocitos de gato. El objetivo fue evaluar las actividades proliferativa y metabólica (como síntesis de proteoglicanos) en los condrocitos a 18 y 24 horas con tinciones y técnicas de microscopía. Los resultados de dicho trabajo demostraron que los condrocitos requieren periodos largos de cultivo para proliferar y más aún para producir proteoglicanos.

En nuestro caso no partimos de condrocitos como tal, sino que con las microesferas sintetizadas, estudiamos la posible interacción que se podía establecer con las hMSCs. Para ello, se utilizaron unas microesferas de CHT (quitosano) y PCL para favorecer la condrogénesis de hMSCs haciendo cultivo tipo pellet. Las muestras se mantuvieron en cultivo durante dos semanas (Fig. 28). En la Fig. 28A podemos ver la interacción inducida entre las hMSCs y las microesferas de CHT en presencia de Dex, TGF- $\beta$ 1 o mezcla de ambos. No se observan grandes diferencias entre las distintas condiciones de cultivo. Se puede ver cómo las células ocupan los intersticios entre las microesferas. El CHT se ha probado en ingeniería tisular y ha demostrado ayudar a mantener el fenotipo condrocítico y favorecer la producción de matriz extracelular en condrocitos (Abarrategi *et al.*, 2010; Breyner *et al.*, 2010). Se ha usado en forma de microesferas para la reparación ósea (Jayasuriya *et al.*, 2009). En la Fig. 28B vemos como las microesferas de PCL en presencia de Dex o TGF- $\beta$ 1 solos parecen no interaccionar con las células. Sin embargo, cuando se ponen en contacto ambos factores, dicha interacción aumenta considerablemente. Aún así, en cuanto a la interacción célula-material, parece mejor material el CHT que la PCL. Los resultados sugieren que la PCL no ofrece ningún indicio biológico a las células para llevar a cabo la condrogénesis, ya que el grado de condrogénesis es dependiente del andamio (Coleman *et al.*, 2007). En cualquier caso, sí se ha comprobado que permite una buena adhesión de las células mesenquimales.



**Figura 28. Imágenes de fluorescencia de condrocitos interaccionando con microesferas de CHT (A) y de PCL (B) en cultivo durante dos semanas.** Los condrocitos fueron cultivados en presencia de Dex, TGF-β1 o mezcla de ambos y después teñidos con DAPI y colágeno de tipo II. Las fotografías fueron realizadas con un aumento del 20x en un microscopio invertido de fluorescencia OLYMPUS IX81.

## 4.8 Estudio de la tasa de proliferación de las hMSCs.

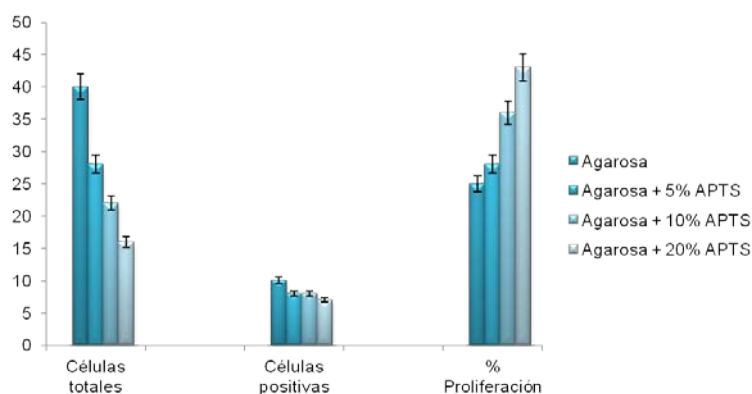
Dado que las hMSCs son células multipotentes que pueden diferenciarse en una variedad de tipos celulares, son de especial interés los estudios sobre materiales que puedan favorecer un determinado tipo de diferenciación. Como paso previo, la interacción que mantengan con los biomateriales es de vital importancia para la proliferación celular y claramente determinante de la función que puedan desempeñar (Wang W *et al.*, 2012). Por ello, en esta sección se exponen ejemplos de materiales que fueron estudiados en función de la tasa de proliferación de las hMSCs.

### 4.8.1 Hidrogeles de agarosa - APTS.

Cómo mencionamos anteriormente en el punto 4.5.3, el conjugado de agarosa-gelatina mostró tener buenas características para adherir las células renales felinas (Sakai *et al.*, 2007). En dicho trabajo se comprobó la proliferación de este conjugado cuantificando el aumento del número de células frente a los días de cultivo. Los resultados mostraron que las células adheridas proliferaban enormemente durante el primer día de cultivo. Además, el número de células aumentaba 20 veces en 5 días.

Los diferentes hidrogeles híbridos de agarosa de nuestro estudio también mostraron resultados favorables respecto a la adhesión de las células mesenquimales. Para el análisis de proliferación, las hMSCs fueron sembradas durante 72 horas sobre la superficie de gelatina (control de crecimiento), de agarosa y los hidrogeles híbridos agarosa-APTS. El análisis se realizó mediante inmunocitoquímica y microscopía de fluorescencia. Para definir las mejores superficies para fines de proliferación, se realizó un análisis cuantitativo con el fin de establecer el número de células por unidad de área para cada tipo de soporte, así como la fracción de células con actividad proliferativa (revelado por el anticuerpo Ki67). Los resultados de este estudio adicional se presentan en el histograma de la Fig. 29 y se refieren al análisis de campos con áreas de  $0,056 \text{ mm}^2$ . El primer conjunto de columnas de la figura nos indica claramente que el soporte de agarosa pura se comporta como un sustrato ideal para la rápida adhesión celular. Mientras, los hidrogeles híbridos presentan una disminución de la adhesión según aumenta la carga de APTS. El segundo conjunto de columnas nos informa del número de células positivas (según Ki67) para cada tipo de superficie, habiendo un comportamiento muy similar para todas ellas. Sin embargo, teniendo en cuenta la fracción de células positivas respecto al total de adheridas, podemos sugerir que las que están sobre las superficies ricas en APTS presentan tasas proliferativas mayores, como indica el tercer conjunto de columnas (Fig. 29). Por tanto, los resultados sugieren que a mayor concentración de APTS, menor es el número de células adheridas pero mayor la tasa de proliferación celular.





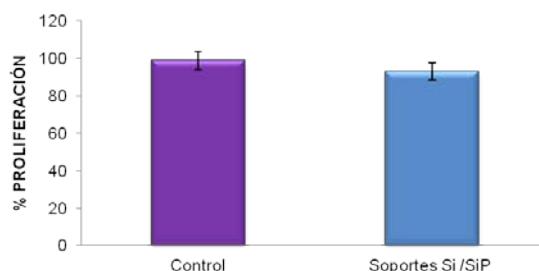
**Figura 29. Histograma con la cuantificación del número de células totales adheridas, las positivas para Ki67 y el porcentaje de proliferación sobre los diferentes andamios.** Las células fueron sembradas sobre la agarosa y los diferentes andamios híbridos de agarosa-APTS durante 72 horas. Se realizó la inmunocitoquímica y el conteo de proliferación.

#### 4.8.2 Soportes de Si/SiP.

En el punto 4.5.1 se describió que las superficies de SiP mostraban propiedades favorables para adherir las células madre de la pulpa dental (Collard-Dutilleul *et al.*, 2011). Por ello, la proliferación celular sobre los diferentes soportes funcionalizados de silicio poroso se midió mediante la cuantificación de la actividad de la fosfatasa ácida. Los resultados demostraron que las células madre de la pulpa dental proliferaban, y no existían diferencias significativas entre los diferentes soportes modificados y el control positivo de proliferación.

En paralelo al estudio de adhesión y morfología descrito anteriormente, y visto que los patrones de Si/SiP presentan buenas propiedades de adhesión, éstos fueron objeto de un estudio de proliferación con Ki67. Las células fueron incubadas durante 72 horas y la proteína Ki67 cuantificada por inmunocitoquímica. Los resultados se expresaron en % de células positivas de Ki67 con respecto al total (200 células) marcadas con DAPI. Según se vio en los núcleos, la tasa proliferativa en estructuras de 40  $\mu\text{m}$  Si/20  $\mu\text{m}$  SiP fue muy similar a la del control, acercándose al 100% (Fig. 30). De este resultado podemos sugerir que sobre estos soportes de silicio tiene lugar una muy favorable proliferación celular.



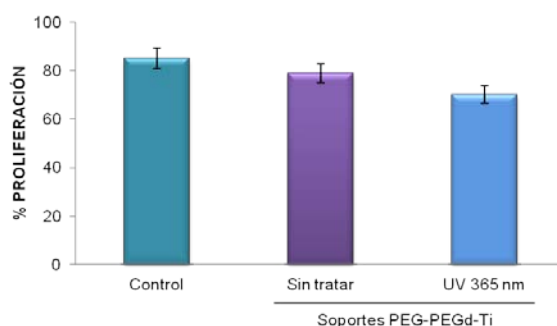


**Figura 30. Cuantificación de la proliferación de las hMSCs adheridas sobre el soporte de 40  $\mu\text{m}$  Si/20  $\mu\text{m}$ .** Las células se sembraron sobre gelatina (control) y los soportes de Si/SiP durante 72 horas. Se realizó la inmunocitoquímica con Ki67 y el conteo de proliferación.

### 4.8.3 Soportes de PEG-PEGd-Ti.

Otros materiales estudiados para cuantificar la proliferación durante 72 horas fueron los sustratos de PEG-PEGd-Ti. Es de señalar que esta caracterización es la continuación de lo expuesto en la sección 4.5.2.

El ensayo sobre los soportes de PEG-PEGd-Ti se hizo en las mismas condiciones experimentales que para los de silicio (sección 4.8.2). Vale la pena observar en la Fig. 31 que tanto las superficies tratadas con UV como las que no, muestran un patrón de proliferación similar al de los controles de gelatina, lo cual fue una clara indicación de las características biocompatibles (Romero-Prado *et al.*, 2006) de los soportes de PEG-PEGd-Ti.



**Figura 31. Cuantificación de la proliferación de las hMSCs sobre los soportes de PEG-PEGd-Ti.** Las células se sembraron sobre gelatina (control), PEG-PEGd-Ti sin tratar y PEG-PEGd-Ti tratado con UV 365 nm. Después de 72 horas, las células se fijaron y se tiñeron con Ki67 para estudiar la proliferación.

## **4.9 Análisis toxicológicos de materiales micro y nano particulados.**

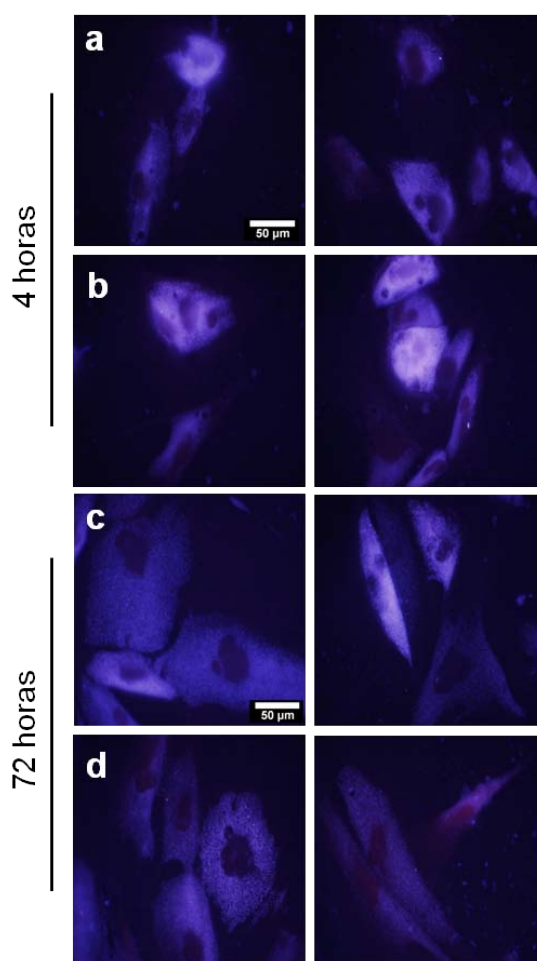
Con este apartado queremos poner de relieve la funcionalidad de las hMSCs para evaluar materiales micro y nanoparticulados. Esto quiere decir que la interacción celular se ve significativamente alterada. De hecho, más que signos de interacción mediante adhesión a superficies se observan los efectos de la integración de los materiales. Esta integración implica procesos transmembrana que hacen a las hMSCs aún más sensibles a los efectos de los materiales analizados. Como ejemplo, nos referimos a partículas micrométricas (SiP de 0,5 a 3  $\mu\text{m}$ ) que integran simultáneamente un contenido de partículas metálicas nanoscópicas (Co de 5 a 30 nm). En el contexto científico actual, son numerosos los estudios que analizan la viabilidad celular de determinadas partículas cuando interaccionan con las hMSCs (Labba *et al.*, 2011; Wang Y *et al.*, 2011).

### **4.9.1 Análisis toxicológicos de partículas de SiPCo con las hMSCs.**

Hay estudios realizados donde se analiza la capacidad funcional de las células en presencia de nanopartículas. Un ejemplo, son las nanopartículas de hierro recubiertas con quitosano en cultivos de hMSCs (Reddy AM *et al.*, 2010). Estas partículas sirvieron para marcar las células (como agente de contraste) y visualizarlas por imagen en resonancia magnética. Con una tinción azul de Prusia se localizó el hierro en las MSCs y con imágenes del SEM se evaluó la endocitosis de las nanopartículas. Los resultados demostraron que no se alteraba la viabilidad celular y además no se encontraron diferencias significativas en la proliferación durante tres semanas comparado con los controles.

Las nanopartículas sintetizadas por nuestro grupo nos permiten localizar las células en cultivo debido a la luminiscencia que presentan. Como ventaja, no hay que usar marcadores específicos para identificarlas, simplemente visualizarlas en un microscopio de fluorescencia.

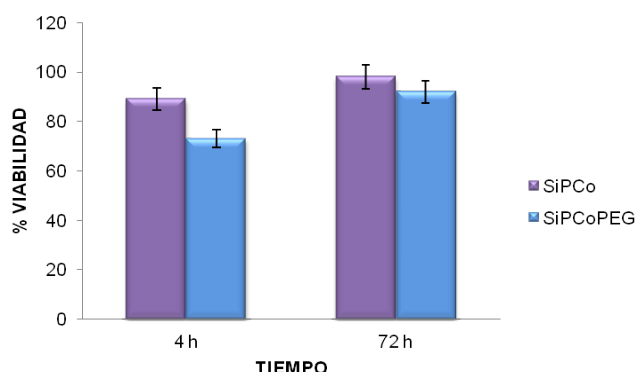
Con las nanopartículas de SiPCo ya sintetizadas y preacondicionadas, realizamos ensayos de cultivo celular para valorar la permeabilidad de la membrana de las hMSCs a dichas partículas. En los resultados de la Fig. 32 se muestra que las hMSCs asimilan las partículas a una concentración de 0,15 mg/ml en el medio, como se deriva de la luminiscencia azul en la célula.



**Figura 32. Imágenes de microscopía de fluorescencia de hMSCs en presencia de partículas de SiPCo conjugadas o no con PEG, durante 4 horas de cultivo (a) SiPCo y (b) SiPCoPEG; y 72 horas (c) SiPCo y (d) SiPCoPEG.** Las fotografías fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia bajo iluminación con luz UV de 350 nm y con un aumento de 60x.

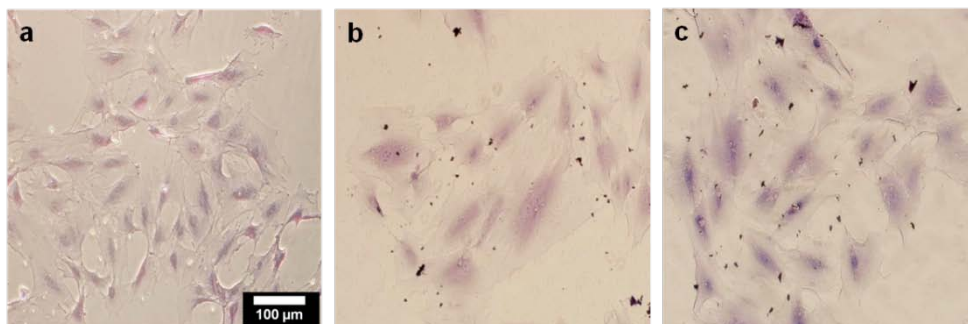
Conviene destacar que esta luminiscencia hace posible su localización sin necesidad de marcadores específicos. La distribución de las nanopartículas tiene lugar a lo largo del citoplasma pero sin internalizar en el núcleo. El tiempo requerido para la asociación de las partículas en las células fue relativamente bajo como sugieren las imágenes obtenidas después de 4 horas de cultivo. Vemos que las células permanecen adheridas, tanto a 4 como a 72 horas y no muestran signos de apoptosis debido a la presencia de las partículas. Aún así, estudiamos el posible efecto citotóxico que estas partículas pudieran tener en las hMSCs en cultivo por medio del ensayo colorimétrico MTT (realizado en las mismas condiciones experimentales que el cultivo). El resultado de las células cultivadas con las partículas se presenta en la Fig. 33. Podemos afirmar que no existe efecto citotóxico en dichas partículas, siendo por tanto alta la viabilidad en los tiempos analizados. Estos tiempos se consideran

funcionales para experimentos en los que se pueda actuar sobre las células mediante campos magnéticos externos que actúen sobre las partículas de SiPCo internalizadas.



**Figura 33. Ensayo MTT de citotoxicidad de las partículas de SiPCo conjugadas o no con PEG.** Después de 4 y 72 horas de cultivo con las hMSCs en presencia de las partículas de SiP se procedió a cuantificar el posible efecto tóxico de estas últimas. El histograma muestra el porcentaje de viabilidad de las partículas funcionalizadas frente a las que no lo son.

Por otro lado, realizamos una tinción de hematoxilina-eosina (HE) para poder estudiar la caracterización morfológica de las hMSCs en presencia de las partículas de SiPCo durante 24 horas en cultivo (Wang F *et al.*, 2009). La Fig. 34, muestra un resumen de tres experimentos independientes. Podemos destacar la ausencia de cambios tales como contracción celular, formas irregulares y condensación nuclear (marcadores de apoptosis) en presencia de las partículas de SiPCo, tanto en las modificadas como en las sin modificar con respecto al control. Este resultado apoya al anterior, y podemos concluir que las partículas de SiPCo no tienen efectos tóxicos a corto plazo (72 horas) en los estudios *in vitro* de hMSCs.



**Figura 34. Caracterización morfológica de las hMSCs en presencia de las partículas de SiPCo.** Se mantuvieron 24 horas en cultivo celular y se realizó una tinción de hematoxilina-eosina (HE). (a) Control sin partículas, (b) hMSCs en presencia de partículas de SiPCo y (c) con partículas de SiPCoPEG. Las fotografías fueron realizadas con un aumento del 20x en un microscopio de contraste de fases (microscopio invertido IX81 Olympus con una cámara digital DP72).

## ***5. Discusión***



Por los años 1980 terminó la época del dogma que proponía a la célula hematopoyética como la única célula embrionaria que podía ser encontrada en los adultos, cuando Caplan denominó a las “*adult marrow derived mesenchymal stem cells*” como MSCs. Diez años más tarde, indicaba junto a otros grupos que estas células eran capaces de diferenciarse en cultivo en diferentes fenotipos mesengénicos (Caplan *et al.* 2013). En la actualidad, en el *Clinical Trials.gov* describen cientos de ensayos en los se incluyen las MSCs en una amplia gama de síntomas y enfermedades. Además, las MSCs contribuyen a la homeostasis vascular, donde los autores argumentan que es resultado de su papel como pericitos. Las enfermedades relacionadas con vasculogénesis, reparación de tejidos y regeneración están implicadas con la regulación de la enzima S-nitrosoglutation reductasa (Gomes *et al.*, 2013). Estas células son igualmente de interés en el análisis de biomateriales, ya que de manera específica mimetizan los tejidos. Por otro lado, los aspectos negativos están igualmente presentes, ya que las MSCs juegan un papel crucial en tumores sólidos y en la difusión de los melanomas (Correa *et al.*, 2011).

Los resultados que mostramos en este trabajo han sido realizados para aumentar el conocimiento sobre dos de los tres aspectos interesantes que se remiten a las MSCs: primero, conocer la biología de las hMSCs estudiando la acción de la VD en la diferenciación ósea, y segundo, el análisis de los biomateriales de composición y microestructura definida que pueden ser usados con distintos fines terapéuticos en la ingeniería de tejidos del esqueleto.

### **La VD regula la proliferación/diferenciación ósea de las hMSCs.**

La VD inhibe la proliferación de las hMSCs inducida por FBS. La acción es enormemente eficaz ya que sólo con 10 nM la proliferación se reduce en un 80%. Además esta acción se mantiene en la proliferación celular inducida por insulina, prolactina, estrógenos y su mezcla. Por tanto, podemos atribuir a la VD un efecto inhibitor dominante en la vía de señalización celular de la insulina, la prolactina y los estrógenos. La respuesta es 10 veces superior a lo descrito por otros grupos. Ésta acción sugiere junto a la modulación encontrada en el citoesqueleto de las hMSCs tratadas con VD que transcurre mediante una diferenciación. Los resultados demuestran que la VD en presencia de medio de crecimiento induce cambios en la organización del citoesqueleto de las hMSCs. Las células pasan de una morfología fibroblástica con la presencia de los filamentos de actina en fibras de estrés y la talina distribuida por la superficie celular, a una morfología de células con gran volumen (formas redondeadas y triangulares) y con la talina distribuida perinuclearmente, siendo estos cambios dependientes de la concentración de VD. Mientras, los filamentos intermedios y los microtúbulos no presentan grandes cambios característicos, simplemente muestran una

morfología alargada sugiriendo un buen estado energético de las células diferenciadas. También es de señalar que, en las mismas condiciones de cultivo celular, la localización y la expresión del receptor de VD no se ven afectadas por las diferentes concentraciones de su ligando.

Otras pruebas descritas en la literatura científica sugieren que la VD está implicada en múltiples procesos, como el de promover la diferenciación celular ósea (Luegmayer *et al.*, 2000). Su acción es fundamental para la maduración de los osteoblastos y regula la producción de proteínas tales como colágeno, fosfatasa alcalina (Manologas *et al.*, 1983) y osteocalcina, necesarias en la formación del hueso nuevo. Desde hace años, se utiliza como marcador óseo la expresión de la fosfatasa alcalina (Hebertson *et al.*, 1997) y nuestros resultados muestran que la VD modula su actividad diferenciadora osteoblástica, y en presencia de prolactina y estrógenos este efecto es mayor.

Datos anteriores del grupo ya manifiestan que las hMSCs aisladas de médula ósea e incubadas en medio de diferenciación, expresan marcadores específicos de hueso, factores de transcripción Gli y transcritos pertenecientes al eje de señalización Indian Hh-PTHrP (Romero-Prado *et al.*, 2006). En paralelo a estos datos, se realizan unos experimentos en presencia de VD, y los resultados demuestran que la VD no altera la expresión de los genes de diferenciación osteocondral ni los de desarrollo óseo. Sin embargo, mostramos un efecto de la VD sobre el citoesqueleto cuando las hMSCs se diferencian a hueso. Las células pierden la morfología fibroblástica, ganan una morfología más redondeada de células más grandes, con gran número de puntos de anclaje y de uniones celulares. Por tanto, podemos sugerir que la VD está implicada en cambios en las proteínas del citoesqueleto como inducen las moléculas de adhesión. Estas células juegan un papel fundamental en el mantenimiento de los tejidos y proporcionan la capacidad de reparación y regeneración tisular. La plasticidad que presentan estas células parece ser debida fundamentalmente a los factores autocrinos y paracrinos que producen y los producidos por otras células del entorno, y que dan la composición al microambiente o nicho.

### ¿Qué relación tiene la VD con el nicho óseo?

Como ya mencionamos anteriormente en la *Introducción*, existe un nicho vascular en la médula ósea con células de distinto linaje que incluye células endoteliales y hematopoyéticas, las cuales segregan factores de crecimiento como el VEGF. El hecho de que la célula endotelial exprese receptores VEGFRs ha atribuido al sistema regulador VEGF-VEGFRs un sistema de tropismo celular en la reparación “*wound-healing*”. Curiosamente la P induce la reparación del hígado después de una hepatectomía induciendo la expresión del



VEGF y del HIF-1 $\alpha$  (*Hypoxia inducible factor 1 alpha*) (Olazabal *et al.*, 2009). Con estos datos entendemos que la VD, la P y el VEGF que producen las células en la médula ósea, hacen que se favorezca la angiogénesis y la vascularidad del nicho medular, y por lo tanto, regulando la vía de señalización de S-nitrosoglutation reductasa (Gomes *et al.*, 2013).

### **La VD y su traducción nuclear.**

El papel que la VD desempeña en el metabolismo óseo proporciona un paradigma para la comprensión de los mecanismos moleculares que operan en la acción de la VD (Arriagada *et al.*, 2010). Promueve la diferenciación de los osteoblastos regulando la transcripción de un número de genes asociados con este fenotipo (Montecino *et al.*, 2007). El VDR, al igual que los otros miembros de la gran familia de receptores nucleares, tiene acciones canónicas que terminan en la unión a secuencias específicas de promotores de genes que regulan (Paredes *et al.*, 2004). Sin embargo, la vía no canónica es menos conocida pero se sabe que la VD modula la vía mTOR (Kim *et al.*, 2012) y con nuestros resultados mostramos que también regula la vía Jak-STAT. Hay evidencias que indican que los componentes de la estructura nuclear (incluyendo poros, matriz nuclear y dominios subnucleares) contribuyen a la distribución y a las actividades de los genes y factores reguladores (Zaidi *et al.*, 2005). En células de mamífero, incluyendo los osteoblastos, el VDR exhibe una señal punteada distribuida de forma nuclear y que es significativamente mayor con la estimulación del ligando (Paredes *et al.*, 2004), sugiriendo que el VDR está interaccionando con componentes de la arquitectura nuclear. Los resultados que obtenemos del estudio de expresión y localización de los diferentes factores de transcripción implicados en la diferenciación ósea mediante microscopía de fluorescencia muestran como Runx2 se localiza de forma perinuclear, aumentando su expresión en presencia de VD. En nuestro caso no se presenta una señal punteada en el núcleo, sino una señal que recuerda a la estructura del retículo endoplasmático. Sin embargo, la expresión de Sox9 permanece en el citoplasma con ciertos acúmulos perinucleares, siendo indiferente el tratamiento utilizado. En el caso de RXR $\alpha$ , los resultados demuestran que el receptor permanece en el núcleo y las células diferenciadas presentan además sitios activos de transcripción que aumentan en presencia de P y VD. Los E sin embargo, presentan una acción antagónica, y cuando están presentes las tres hormonas, se observa como la P y la VD lideran sobre este. Estos resultados sugieren que la VD modula la transcripción de los transcriptomas de las hMSCs en diferenciación, al poder alterar la suma de las diferentes hormonas.

Es conocido que las MSCs pueden sufrir un cambio hacia osteoblasto o adipocito, debido a numerosos factores de transcripción que regulan dichos procesos. Uno de los más importantes implicados en el metabolismo energético es el c/EBP. De los resultados

obtenidos de las imágenes de fluorescencia realizadas de los factores c/EBP $\alpha$ , c/EBP $\beta$  y GR, podemos sugerir, que en general, no se observan cambios significativos de regulación en los tratamientos utilizados. Es característico señalar cómo la expresión de c/EBP $\alpha$  aumenta en presencia de VD, y con EVD, éste efecto se sigue manteniendo. Esto nos lleva a pensar que la VD tiene un efecto dominante sobre la acción de los E.

También determinamos la presencia de la vía Jak-STAT en las células progenitoras. Se sabe que esta vía está involucrada en muchos procesos biológicos, incluyendo la regulación de las células madre. Los primeros estudios se realizaron en *Drosophila*, y estaban implicados en el control del mantenimiento de las células madre en la línea germinal masculina o nicho. Posteriormente, se ha demostrado que la vía juega un papel en otros nichos, ya no sólo en *Drosophila* sino también en mamíferos (Stine *et al.*, 2013). Recientemente se ha publicado un trabajo donde se muestra la relación VD y Jak-STAT3 en ratones con periodontitis diabética (Wang Q *et al.*, 2013), y nuestros resultados también demuestran que la VD regula la vía Jak-STAT. En nuestro caso, la STAT5 puede formar complejo con el ER, como se observa en las imágenes la colocalización en los núcleos de ambas proteínas. Sin embargo, resultados previos del laboratorio mostraron que el tratamiento de las hMSCs con Dex provoca la salida del ER del núcleo. Por tanto, estos datos necesitan ser explorados en profundidad realizando más ensayos experimentales y estudiando la relación con la vía Jak-STAT.

En la actualidad, la terapia celular se ha propuesto como herramienta clínica para la reparación de tejidos dañados y las células madre mesenquimales han cobrado gran importancia por su potencial en dichas terapias. Estas células pueden diferenciarse a diversos tejidos como hueso, cartílago, estroma y tejido graso a través del proceso mesengénico (Caplan *et al.*, 2006). Estudios recientes, han demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* una mayor plasticidad celular, ya que son capaces de originar células endoteliales, musculares e incluso células neuronales. Una de las aplicaciones de los sustitutos óseos se sirve de células madre que son cultivadas en un soporte/andamio *in vitro* en condiciones óptimas para la formación ósea. De esta manera se provee del ambiente apropiado en el que las células pueden desarrollar su función, a partir del uso combinado de factores y biomateriales.

En este trabajo, se han utilizado los cultivos celulares como herramienta básica en los estudios de biocompatibilidad. Éstos nos permiten determinar cómo responden las células a la presencia de diferentes materiales o superficies funcionalizadas, evaluando cómo se produce la adhesión, la extensión, la migración y la proliferación celular sobre el andamio. Es de señalar que las células necesitan adherirse a una superficie para sobrevivir, y además, esta última puede estar modificada, de modo que es importante conocer sus propiedades para el éxito de cada aplicación. Buxboim *et al.*, 2010, ya describieron cómo las células poseen mecanismos táctiles que las permiten sentir las diferencias entre una superficie rígida o blanda. Con estas sugerencias, realizamos estudios para analizar el comportamiento de las hMSCs sobre diferentes superficies de biomateriales. En nuestro trabajo pudimos comprobar cómo las células son capaces de diferenciar los soportes tratados frente a los que no, como en el caso de las láminas de PEG-PEGd-Ti. El número de células adheridas disminuye en las superficies expuestas a UV, modificando también la morfología celular. La biocompatibilidad de las superficies es corroborada por la expresión similar de Ki67 con respecto al control de gelatina. Obtenemos una situación parecida cuando cultivamos las células sobre superficies de hidrogeles de agarosa-APTS. Al estudiar la adhesión y la proliferación sobre estas películas, podemos ver que el número total de células adheridas disminuye y la tasa de proliferación aumenta a medida que el contenido de APTS crece en los híbridos. Por lo tanto, la densidad de células proliferativas se estima significativamente comparable para todos los soportes. De hecho, el estado morfológico de proliferación de las hMSCs en soportes ricos en APTS (cargados positivamente) que habían sido estudiados previamente, consistía en una tendencia a la extensión de filopodios (Arroyo-Hernández *et al.*, 2007). Sin embargo, no hay evidencias directas, tales como las vías de señalización químicas, que hayan sido establecidas entre la capacidad de hMSCs para formar fuertes adhesiones focales y su estado de proliferación.

### ¿Cuál es la importancia de la matriz extracelular?

La matriz extracelular (MEC) representa una red tridimensional que engloba todos los órganos, tejidos y células del organismo. Se pensaba que jugaba un papel esencial en la organización tisular, y que la función principal era la formación de un entramado de sostén. Es evidente, que la matriz desempeña un papel mucho más activo y complejo en la regulación del comportamiento de las células que están en contacto con ella, afectando a su desarrollo, su migración, su proliferación, su forma y su función.

En nuestro trabajo, la función general de los micropatrones de Si/SiP, es de hecho la de actuar como matriz extracelular artificial, permitiendo la difusión de metabolitos y funcionando como guía estructural para el crecimiento celular. Las primeras observaciones sobre los patrones de Si/SiP demuestran que las respuestas de adhesión dependen de las dimensiones de los raíles, por lo que podemos afirmar que describen una adhesión superficial preferente. Las grandes áreas de silicio atraen a las células mientras que el SiP se comporta como una superficie antiadherente con características hidrofílicas similares a las obtenidas por modificaciones con PEG (Manso-Silvan *et al.*, 2007) o dextrano (McLean *et al.*, 2000). Mediante la reducción de la anchura del raíl de Si, las hMSCs intentan aumentar la presencia del citoesqueleto de actina en áreas de Si saltando sobre los raíles de SiP, al mismo tiempo que presentan relaciones proliferativas comparables a las de la superficie control. La polimerización de la tubulina y especialmente la de los filamentos de actina en estas células, indica una polarización a lo largo de los raíles y una actividad de la migración orientada. De hecho, las células sobre los patrones de Si/SiP muestran una red bien estructurada de microtúbulos cuya elasticidad es mucho menor que la asociada a los filamentos de actina (Janmey *et al.*, 1991). Las conformaciones celulares han sido observadas en las células que se adaptan a las limitaciones de la superficie por mecanoregulación (Menezes *et al.*, 2008). Es relevante destacar que nuestros resultados indican que en la localización sobre zonas de SiP, la  $\beta$ -catenina presenta áreas más reducidas con respecto a la observada por el citoesqueleto de actina. Podemos sugerir por tanto que el SiP puede desempeñar un papel en la retracción de la  $\beta$ -catenina, el cual puede favorecer el estado migratorio de la célula. Se ha visto que el SiP confiere propiedades atractivas en el campo biomédico, ya que presenta biocompatibilidad con el epitelio, con los tejidos osteocondrales, neuronales y los de ojo (Low *et al.*, 2009), lo que abre camino para su uso en la ingeniería de tejidos como andamios celulares. También ha sido evaluado el soporte de Si/SiP para el estudio de la proliferación celular. Trabajos anteriores demuestran que el SiP funcionalizado con grupos amino (Arroyo-Hernández *et al.*, 2007 (B)) favorece la proliferación de células mesenquimales humanas procedentes de médula ósea sobre su superficie. En nuestro caso, el soporte de Si/SiP

demostró ser favorable como muestran los resultados de proliferación con Ki67, ya que se obtenía una cuantificación similar al control.

El SiP también ha sido desarrollado en forma de partículas. En la actualidad, son utilizadas como agentes para la liberación controlada de fármacos (Hernandez *et al.*, 2012) y medicamentos insolubles (Wang F *et al.*, 2010), como marcador celular denominado “*cell tracker*” (Tasciotti *et al.*, 2008) y en terapias contra el cáncer (Liu *et al.*, 2012). En nuestro estudio se realiza un análisis toxicológico de las partículas nanoestructuradas de SiP con Co infiltrado. Las partículas son conjugadas con PEG, con vistas a aumentar las propiedades hidrofílicas de las mismas y para ir abriendo camino a los mecanismos de PEGilación para la formación de complejos biomoleculares dirigibles. En 4 horas de cultivo, las partículas consiguen internalizarse en las hMSCs y son consideradas biocompatibles como desvelan, tanto el ensayo de citotoxicidad MTT como la tinción de HE. Los resultados demuestran que las partículas presentan una alta viabilidad en los cultivos, al menos en las condiciones de trabajo utilizadas similares a las de otros autores (Kwon *et al.*, 2009; Nabeshi *et al.*, 2011).

### **Sistemas de cultivo celular, ¿en 2D ó 3D?**

La formación de una estructura porosa es de suma importancia en el cultivo celular. En los materiales con poros interconectados, las células pueden migrar y penetrar dentro de los poros, favoreciendo de este modo el contacto y la proliferación celular, así como el transporte de nutrientes y desechos desde y hacia el medio circundante. La angiogénesis y la organización del tejido son procesos que se ven afectados tanto por la porosidad del material como por la morfología del poro. Por eso utilizamos las hMSCs para analizar la influencia de las geometrías en procesos de ingeniería de tejidos, como en los soportes de resina epoxi recubiertos con DLC. Se diseñan varios andamios en 2D y en 3D, con diferentes tamaños de poro y topografías de la superficie, para el posterior estudio *in vitro* ligados al crecimiento celular y a la formación del tejido. Los resultados muestran que los diferentes tamaños de poro y las topografías de la superficie pueden ser combinados para promover el crecimiento celular para diferentes aplicaciones en ingeniería biomédica, siendo la topografía de la superficie más notable que el tamaño del poro. La funcionalización de la superficie del andamio con DLC demuestra ser adecuada para mejorar las propiedades biológicas, incluso usando la resina epoxi como sustrato.

Por todo lo comentando anteriormente, cultivar células en 2D es un método conveniente, pero, no simula completamente el crecimiento celular *in vivo*. En los seres vivos las células crecen frecuentemente en 3D construyendo tejidos y órganos. Los sistemas de cultivo celular en 3D ofrecen ventajas frente a los cultivos convencionales, ya que facilitan estudiar las

interacciones entre los factores de crecimiento y las células, así como entre las células y los agentes terapéuticos. Otra de las aproximaciones a los cultivos 3D es el andamio PCL con estructura hc, al que se le modifica su superficie con diferentes tratamientos de plasma provocando leves alteraciones topográficas. Los ensayos de interacción de hMSCs con andamios de PCLhc muestran una buena adhesión en todos los tipos de superficie, aunque el Ar, y especialmente ALL, muestra una morfología celular alargada característica. Las células cultivadas sobre muestras de PCLhcALL presentan un comportamiento más atractivo desde el punto de vista de la polaridad celular y de las vesículas, necesaria para secretar factores, componentes de la matriz extracelular y la migración (Menezes *et al.*, 2008). También son ensayados sobre esta superficie patrones de diferenciación de hueso, incluyendo VD al medio de cultivo, ya que puede regular la expresión de marcadores fenotípicos osteoblásticos. Los resultados demuestran que según aumenta la concentración de VD, la constricción de la actina disminuye en las hMSCs, mientras que los filamentos intermedios se extienden. Bajo el estímulo de VD, las interacciones sobre PCLhcALL son inducidas en las hMSCs que responden formando vesículas intracelulares. El desarrollo de estas estructuras puede ser identificado con un estado de diferenciación osteocondroblástico (Abdelmagid *et al.*, 2008; Nabavi *et al.*, 2008) o de mineralización ósea, ya que la MEC está implicada en dicho proceso y contiene numerosas proteínas las cuales pueden ser reguladas por VD, como por ejemplo la osteocalcina, la osteopontina, las sialoproteínas y los colágenos. Para dar lugar a la mineralización, hay que tener en cuenta las vesículas de la matriz, que brotan de la membrana plasmática de los osteoblastos y se liberan en la MEC (Anderson, 1995). Por lo tanto, se podría concluir que la VD actúa en la fase temprana de diferenciación de osteoblastos para acelerar la mineralización ósea mediada por la estimulación de la producción de vesículas de matriz (Woeckel *et al.*, 2010).

La obtención de tales soportes con monocapas de células diferenciadas puede ser ventajosa para la reparación del hueso/cartílago dañado. Las ventajas derivan de la presencia de un soporte sólido para las hMSCs con un potencial adicional, tanto para la alimentación como para el intercambio de señales a través de los poros, siendo la principal contribución de la estructura hc (en vista de la ausencia de la obstrucción de poros por la colonización celular). La reparación funcional de los tejidos por las hMSCs cultivadas sobre PCLhcALL así como la capacidad de comunicarse entre ellas o con otros tipos de células son aspectos actuales de estudio. Los resultados demuestran que la PCLhc es un excelente scaffold para la diferenciación de las hMSCs y un buen sustrato para aplicaciones de ingeniería de tejidos dadas sus propiedades de biodegradación que permiten su substitución paulatina por la MEC nativa. Para una comprensión detallada de estos patrones, se deben realizar más estudios con hMSCs en condiciones de diferenciación o incluyendo otras líneas celulares que podrían ayudar en la determinación de patrones específicos para las células que participan en terapias regenerativas o en cáncer.

Por otro lado, en la actualidad, el gran desarrollo de la biotecnología ha contribuido al descubrimiento de nuevos sistemas de liberación de fármacos, como son las microesferas. Estas pueden ser sintetizadas con una gran variedad de sustancias poliméricas biodegradables, que permiten aumentar el efecto farmacológico. Nosotros en este trabajo nos hemos centrado en microesferas de PCL y CHT pero con otro objetivo, favorecer la condrogénesis en hMSCs. Los resultados nos sugieren que permiten una buena adhesión de las células mesenquimales, como se puede observar en la interacción que se establece entre el biomaterial y las células.

En general, los resultados obtenidos en este trabajo, aunque son preliminares, se pueden considerar positivos, ya que muestran una buena interacción célula-material a través de los diferentes análisis de los biomateriales. Por tanto, sugerimos que las hMSCs representan el reservorio de células reparadoras, con reconocida plasticidad y capacidad proliferativa, que pueden migrar a diferentes tejidos y contribuir a la regeneración de sitios dañados. Se cree que la señal que dispara el proceso podría ser la propia lesión. Las células migran desde el nicho hasta el lugar del daño y se diferencian en el tipo celular requerido. Estudios recientes han permitido identificar un número de moléculas solubles producidas por las MSCs, que una vez liberadas en los sitios dañados, ejercen allí una acción autocrina y paracrina (Caplan *et al.*, 2006; Wang X *et al.*, 2013).





## ***6. Conclusiones***



1. Nuestro trabajo muestra que la VD es un regulador de las células troncales aisladas de la médula ósea humana. El VDR se expresa en las hMSCs y su activación por ligando modula la proliferación/diferenciación, tanto por su vía canónica como no canónica.
2. Los ensayos de proliferación [<sup>3</sup>H]-Timidina y Ki67, demostraron que la VD en concentraciones nanomolares es capaz de reducir la velocidad de proliferación de las hMSCs inducida por suero y ligandos como prolactina y estrógenos y conduce a cambios en la organización del citoesqueleto, tamaño y morfología celular. Los mecanismos celulares empleados en los procesos descritos tienen aspectos que necesitan ser explorados pero son compatibles con un proceso de diferenciación inducida predominantemente por la vitamina D en las células progenitoras de hueso.
3. Los resultados muestran que las hMSCs diferenciadas en presencia de VD no producen cambios de expresión del VEGF. Éste permanece constante independientemente del tratamiento utilizado lo cual añade evidencias al papel de la VD en la angiogénesis tanto en el proceso de reparación osteocondral como en las metástasis.
4. Los resultados muestran la regulación de los transcriptomas de las hMSCs en el metabolismo energético y los específicos de hueso como Runx2. Los datos sugieren que la VD posee un efecto dominante sobre los estrógenos que necesita ser explorada. Además, los datos muestran que la VD regula los factores de transcripción STATs y conduce la asociación nuclear del receptor de estrógenos, sin ligando, con la STAT5
5. Las hMSCs son una herramienta útil en terapia celular debido a la remodelación y a la necesidad de reparación ósea. Los datos muestran que las células hMSCs son analizadores de la composición/estructura micro-nano de superficies de los biomateriales.
6. Las hMSCs presentan sobre los hidrogeles híbridos de agarosa-APTS una menor adhesión, pero tasas proliferativas mayores, según aumenta la carga de APTS. Sin embargo, el número de células adheridas sobre los soportes de PEG-PEGd-Ti tratados con UV disminuye respecto al control mientras que la proliferación celular se mantiene invariable.

7. Las hMSCs cultivadas sobre los patrones de Si/SiP demuestran que su respuesta a la adhesión parece depender de la disponibilidad del Si respecto a su propio tamaño pero la proliferación se muestra favorable con respecto a los controles. Por otro lado, las partículas de SiPCo se utilizan como marcador celular, ya que nos permiten ver la posición exacta de las células. Las partículas se encuentran distribuidas por todo el citoplasma y no presentan efectos citotóxicos.
8. Los soportes de resina epoxi recubiertos con DLC han demostrado que la forma de los andamios y la morfología de las superficies tienen mayor impacto que el tamaño del poro. Los diferentes diseños obtenidos (2D y 3D) permiten realizar estudios *in vitro* de adhesión y de crecimiento celular.
9. En los ensayos de adhesión sobre los andamios 3D de PCLhc se observa que las hMSCs se adaptan a todos los tipos de superficie aunque se detectan cambios en su citoesqueleto, siendo el de PCLhcALL el más favorable. Estos mismos resultados se obtuvieron sobre este sustrato en presencia de diferentes concentraciones de VD. También es de señalar, que las microesferas de PCL y QHT presentan buenas características de biocompatibilidad como muestran las interacciones producidas entre las células y el biomaterial en el cultivo tipo pellet.

## ***7. Bibliografía***



## A

**Abarrategi A, Lópiz-Morales Y, Ramos V, Civantos A, López-Durán L, Marco F, López-Lacomba JL.** 2010. Chitosan scaffolds for osteochondral tissue regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 95(4):1132-41.

**Abdelmagid SM, Barbe MF, Rico MC, Salihoglu S, Arango-Hisijara I, Selim AH, Anderson MG, Owen TA, Popoff SN, Safadi FF.** 2008. Osteoactivin, an anabolic factor that regulates osteoblast differentiation and function. *Exp Cell Res*. 314(13):2334-51.

**Anderson HC.** 1995. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop Relat Res*. (314):266-80.

**Aranda A, Pascual A.** 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*. 81(3):1269-304.

**Arora P, Sindhu A, Dilbaghi N, Chaudhury A, Rajakumar G, Rahuman AA.** 2012. Nano-regenerative medicine towards clinical outcome of stem cell and tissue engineering in humans. *J Cell Mol Med*. 16(9):1991-2000.

**Arroyo-Hernández M, Manso-Silvan M, López-Elvira E, Muñoz A, Climent A, Duart JM.** 2007. One step processing of aminofunctionalized gate oxides. *Biosens Bioelectron*. 22(12):2786-9.

**Arroyo-Hernández M, Pérez-Rigueiro J, Manso-Silvan M, Martínez-Duart JM.** 2007. Bioactivity test for amine-based functionalized meso- and macro-porous silicon substrates. *Mat. Sci. Eng. C-Biomimetic and Supramolecular Systems*. 27(5-8):1211-1214. (B)

**Artaza JN, Sirad F, Ferrini MG, Norris KC.** 2010. 1,25(OH)<sub>2</sub>vitamin D<sub>3</sub> inhibits cell proliferation by promoting cell cycle arrest without inducing apoptosis and modifies cell morphology of mesenchymal multipotent cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 119(1-2):73-83.

**Arthur A, Zannettino A, Gronthos S.** 2009. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. *J Cell Physiol*. 218(2):237-45.

**Azami M, Moosavifar MJ, Baheiraei N, Moztarzadeh F, Ai J.** 2012. Preparation of a biomimetic nanocomposite scaffold for bone tissue engineering via mineralization of gelatin hydrogel and study of mineral transformation in simulated body fluid. *J Biomed Mater Res A*. 100(5):1347-55.

## B

**Barsony J, McKoy W.** 1992. Molybdate increases intracellular 3',5'-guanosine cyclic monophosphate and stabilizes vitamin D receptor association with tubulin-containing filaments. *J Biol Chem*. 267(34):24457-24465.

**Barsony J, Renyi I, McKoy W.** 1997. Subcellular distribution of normal and mutant vitamin D receptors in living cells. Studies with a novel fluorescent ligand. *J Biol Chem*. 272(9):5774-82.

**Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG.** 2001. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 19(3):180-92.

**Bini F, Frati A, Garcia-Gil M, Battistini C, Granado M, Martinesi M, Mainardi M, Vannini E, Luzzati F, Caleo M, Peretto P, Gomez-Muñoz A, Meacci E.** 2012. New signalling pathway involved in the anti-proliferative action of vitamin D(3) and its analogues in human neuroblastoma cells. A role for ceramide kinase. *Neuropharmacology*. 63(4):524-37.

**Bord S, Horner A, Beavan S, Compston J.** 2001. Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(5):2309-14.

**Bran GM, Stern-Straeter J, Hörmann K, Riedel F, Goessler UR.** 2008. Apoptosis in bone for tissue engineering. *Arch Med Res.* 39(5):467-82.

**Breyner NM, Hell RC, Carvalho LR, Machado CB, Peixoto Filho IN, Valério P, Pereira MM, Goes AM.** 2010. Effect of a three-dimensional chitosan porous scaffold on the differentiation of mesenchymal stem cells into chondrocytes. *Cells Tissues Organs.* 191(2):119-28.

**Buxboim A, Ivanovska IL, Discher DE.** 2010. Matrix elasticity, cytoskeletal forces and physics of the nucleus: how deeply do cells 'feel' outside and in? *J Cell Sci.* 123(Pt 3):297-308.

## **e**

**Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringham FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT.** 2003. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 425(6960):841-6.

**Cancedda R, Mastrogiacomo M, Bianchi G, Derubeis A, Muraglia A, Quarto R.** 2003. Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone. *Novartis Found Symp.* 249:133-43.

**Caplan AI.** 1991. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 9(5):641-50.

**Caplan AI.** 2008. All MSCs are pericytes?. *Cell Stem Cell.* 3(3):229-30.

**Caplan AI.** 2009. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol.* 217(2):318-24.

**Caplan AI.** 2013. Adult mesenchymal stem cells and the NO pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(8):2695-6.

**Caplan AI, Correa D.** 2011. PDGF in bone formation and regeneration: new insights into a novel mechanism involving MSCs. *J Orthop Res.* 29(12):1795-803.

**Caplan AI, Dennis JE.** 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 98(5):1076-84.

**Carlberg C, Seuter S.** 2010. Dynamics of nuclear receptor target gene regulation. *Chromosoma.* 119(5):479-84.

**Carlevaro MF, Cermelli S, Cancedda R, Descalzi Cancedda F.** 2000. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *J Cell Sci.* 113 (Pt 1):59-69.

**Centrella M, Christakos S, McCarthy TL.** 2004. Skeletal hormones and the C/EBP and Runx transcription factors: interactions that integrate and redefine gene expression. *Gene.* 2004. 342(1):13-24.

**Coleman RM, Case ND, Guldberg RE.** 2007. Hydrogel effects on bone marrow stromal cell response to chondrogenic growth factors. *Biomaterials.* 28(12):2077-86.

**Collard-Dutilleul PY, Secret E, Panayotov I, Gergely C, Cunin F, Cuisinier F.** 2011. SC10 - Dental pulp stem cells adhesion on surface-modified porous silicon: towards a scaffold for regenerative medicine. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol.* 50(1):47-51.



**Correa D, Lin P, Caplan AI.** 2011. Bone marrow pericytes/MSCs: gatekeepers controlling skeletal metástasis from melanoma. MSC 2011, Cleveland, OH.

**Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B.** 2008. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 3(3):301-13.

## **CH**

**Chai F, Mathis N, Blanchemain N, Meunier C, Hildebrand HF.** 2008. Osteoblast interaction with DLC-coated Si substrates. *Acta Biomater.* 4(5):1369-81.

**Charles-Harris M, Koch MA, Navarro M, Lacroix D, Engel E, Planell JA.** 2008. A PLA/calcium phosphate degradable composite material for bone tissue engineering: an in vitro study. *J Mater Sci Mater Med.* 19(4):1503-13.

## **D**

**Da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB.** 2008. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 26(9):2287-99.

**Dhawan P, Christakos S.** 2010. Novel regulation of 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase (24(OH)ase) transcription by glucocorticoids: cooperative effects of the glucocorticoid receptor, C/EBP beta, and the Vitamin D receptor in 24(OH)ase transcription. *J Cell Biochem.* 110(6):1314-23.

**Dhawan P, Wieder R, Christakos S.** 2009. CCAAT enhancer-binding protein alpha is a molecular target of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem.* 284(5):3086-95.

**Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E.** 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8(4):315-7.

**Doyle AD, Wang FW, Matsumoto K, Yamada KM.** 2009. One-dimensional topography underlies three-dimensional fibrillar cell migration. *J Cell Biol.* 184(4):481-90.

**Drabsch Y, Ten Dijke P.** 2012. TGF- $\beta$  signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 31(3-4):553-68.

**Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E.** 2005. Vitamin D. *American Journal of Physiology Renal Physiology.* 289(1):8-28.

## **E**

**Ellis SL, Grassinger J, Jones A, Borg J, Camenisch T, Haylock D, Bertoncello I, Nilsson SK.** 2011. The relationship between bone, hemopoietic stem cells, and vasculature. *Blood.* 118(6):1516-24.

**Endo I, Inoue D, Mitsui T, Umaki Y, Akaike M, Yoshizawa T, Kato S, Matsumoto T.** 2003. Deletion of vitamin D receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors. *Endocrinology*. 144(12):5138-5144.

## **F**

**Feng J, Mantesso A, Sharpe PT.** 2010. Perivascular cells as mesenchymal stem cells. *Expert Opin Biol Ther*. 10(10):1441-51.

**Franz-Odenaal TA.** 2011. Induction and patterning of intramembranous bone. *Front Biosci*. 16:2734-46.

**Freemark M, Driscoll P, Maaskant R, Petryk A, Kelly PA.** 1997. Ontogenesis of prolactin receptors in the human fetus in early gestation. Implications for tissue differentiation and development. *J Clin Invest*. 99(5):1107-17.

**Freyria AM, Mallein-Gerin F.** 2012. Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: the indisputable role of growth factors. *Injury*. 43(3):259-65.

**Friedenstein A.** 1989. Stromal-hematopoietic interrelationships: Maximov's ideas and modern models. *Haematol Blood Transfus*. 32:159-67.

## **G**

**Gomes SA, Rangel EB, Premer C, Dulce RA, Cao Y, Florea V, Balkan W, Rodrigues CO, Schally AV, Hare JM.** 2013. S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) enhances vasculogenesis by mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(8):2834-9.

**Granero-Molto F, Weis JA, Longobardi L, Spagnoli A.** 2008. Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: application to bone and cartilage repair. *Expert Opin Biol Ther*. 8(3):255-68.

**Grimley PM, Dong F, Rui H.** 1999. Stat5a and Stat5b: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 10(2):131-57.

**Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V.** 2004. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov*. 3(11):950-64.

**Gupta PK, Das AK, Chullikana A, Majumdar AS.** 2012. Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Stem Cell Res Ther*. 3(4):25.

**Gutierrez S, Javed A, Tennant DK, van Rees M, Montecino M, Stein GS, Stein JL, Lian JB.** 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) beta and delta activate osteocalcin gene transcription and synergize with Runx2 at the C/EBP element to regulate bone-specific expression. *J Biol Chem*. 277(2):1316-23.

## H

**Haussler MR, Haussler CA, Jurutka PW, Thompson PD, Hsieh JC, Remus LS, Selznick SH, Whitfield GK.** 1997. The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states. *J Endocrinol.* 154 Suppl:S57-73.

**Haycock JW.** 2011. 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. *Methods Mol Biol.* 695:1-15.

**Henriquez B, Hepp M, Merino P, Sepulveda H, van Wijnen AJ, Lian JB, Stein GS, Stein JL, Montecino M.** 2011. C/EBP $\beta$  binds the P1 promoter of the Runx2 gene and up-regulates Runx2 transcription in osteoblastic cells. *J Cell Physiol.* 226(11):3043-52.

**Henson JH.** 1999. Relationships between the actin cytoskeleton and cell volume regulation. *Microsc Res Tech.* 47(2):155-62.

**Herbertson A, Aubin JE.** 1997. Cell sorting enriches osteogenic populations in rat bone marrow stromal cell cultures. *Bone* 21(6):491-500

**Hernandez M, Recio G, Martin-Palma RJ, Garcia-Ramos JV, Domingo C, Sevilla P.** 2012. Surface enhanced fluorescence of anti-tumoral drug emodin adsorbed on silver nanoparticles and loaded on porous silicon. *Nanoscale Res Lett.* 7(1):364.

**Hewison M.** 2010. Vitamin D and the intracrinology of innate immunity. *Mol Cell Endocrinol.* 321(2):103-11.

## J

**Ippokratis P, Peter V Giannoudis.** 2005. Biology of mesenchymal stem cells. *Int J Care Injured.* 36S:S8-S12.

**Iynedjian PB, Hanson RW.** 1977. Messenger RNA for renal phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). Its translation in a heterologous cell-free system and its regulation by glucocorticoids and by changes in acid-base balance. *J Biol Chem.* 252(23):8398-403.

## J

**Janicki P, Schmidmaier G.** 2011. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury.* 42 Suppl 2:S77-81.

**Janmey PA, Euteneuer U, Traub P, Schliwa M.** 1991. Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *J Cell Biol.* 113(1):155-60.

**Javed A, Guo B, Hiebert S, Choi JY, Green J, Zhao SC, Osborne MA, Stifani S, Stein JL, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein GS.** 2000. Groucho/TLE/R-esp proteins associate with the nuclear matrix and repress RUNX (CBF(alpha)/AML/PEBP2(alpha)) dependent activation of tissue-specific gene transcription. *J Cell Sci.* 113 (12):2221-31.

**Jayasuriya AC, Bhat A.** 2009. Optimization of scaled-up chitosan microparticles for bone regeneration. *Biomed Mater.* 4(5):055006.

**Jeong CG, Zhang H, Hollister SJ.** 2012. Three-dimensional polycaprolactone scaffold-conjugated bone morphogenetic protein-2 promotes cartilage regeneration from primary chondrocytes in vitro and in vivo without accelerated endochondral ossification. *J Biomed Mater Res A.* 100(8):2088-96.

## **K**

**Kalluri R, Weinberg RA.** 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 119(6):1420-8.

**Kamishina H, Miyabayashi T, Clemmons RM, Farese JP, Uhl EW.** 2006. Three-dimensional culture of feline articular chondrocytes in alginate microspheres. *J Vet Med Sci.* 68(11):1239-42.

**Kanitkar M, Tailor HD, Khan WS.** 2011. The use of growth factors and mesenchymal stem cells in orthopaedics. *Open Orthop J.* 5 Suppl 2:271-5.

**Karsenty G, Ferron M.** 2012. The contribution of bone to whole-organism physiology. *Nature.* 481(7381):314-20.

**Katzenellenbogen BS, Choi I, Delage-Mourroux R, Ediger TR, Martini PG, Montano M, Sun J, Weis K, Katzenellenbogen JA.** 2000. Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 74(5):279-85.

**Kessler MW, Grande DA.** 2008. Tissue engineering and cartilage. *Organogenesis.* 4(1):28-32.

**Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ.** 2005. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 121(7):1109-21.

**Kim TH, Choi SJ, Lee YH, Song GG, Ji JD.** 2012. Combined therapeutic application of mTOR inhibitor and vitamin D(3) for inflammatory bone destruction of rheumatoid arthritis. *Med Hypotheses.* 79(6):757-60.

**Klaushofer K, Varga F, Glantschnig H, Fratzl-Zelman N, Czerwenka E, Leis HJ, Koller K, Peterlik M.** 1995. The regulatory role of thyroid hormones in bone cell growth and differentiation. *J Nutr.* 125(7 Suppl):1996S-2003S.

**Kon E, Filardo G, Roffi A, Di Martino A, Hamdan M, De Pasqual L, Merli ML, Marcacci M.** 2012. Bone regeneration with mesenchymal stem cells. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 9(1):24-7.

**Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, Dezawa M.** 2011. Bone marrow mesenchymal cells: how do they contribute to tissue repair and are they really stem cells? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 59(5):369-78.

**Kwon YM, Xia Z, Glyn-Jones S, Beard D, Gill HS, Murray DW.** 2009. Dose-dependent cytotoxicity of clinically relevant cobalt nanoparticles and ions on macrophages in vitro. *Biomed Mater.* 4(2):025018.

## L

**Labbaf S, Tsigkou O, Müller KH, Stevens MM, Porter AE, Jones JR.** 2011. Spherical bioactive glass particles and their interaction with human mesenchymal stem cells in vitro. *Biomaterials*. 32(4):1010-8.

**Langer R, Vacanti JP.** 1993. Tissue engineering. *Science*. 260(5110):920-6.

**Lee HR, Kim TH, Choi KC.** 2012. Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , identified by estrogen receptor knockout mouse. *Lab Anim Res*. 28(2):71-6.

**Lefebvre V, Bhattaram P.** 2010. Vertebrate skeletogenesis. *Curr Top Dev Biol*. 90:291-317.

**Leïchle T, Manso-Silván M, Belaubre P, Valsesia A, Ceccone G, Rossi F, Saya D, Pourciel JB, Nicu L, Bergaud C.** 2005. Nanostructuring surfaces with conjugated silica colloids deposited using silicon-based microcantilevers. *Nanotechnology* 16, 525.

**Lekstrom-Himes J, Xanthopoulos KG.** 1998. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem*. 273(44):28545-8.

**Lennon DP, Haynesworth SE, Bruder SP, Caplan AI.** 1996. Human and animal mesenchymal progenitor cells from bone marrow: Identification of serum of optimal selection and proliferation. *In Vitro Cell Dev Biol* 32:602-611.

**Li Calzi S, Neu MB, Shaw LC, Kielczewski JL, Moldovan NI, Grant MB.** 2010. EPCs and pathological angiogenesis: when good cells go bad. *Microvasc Res*. 79(3):207-16.

**Li N, Tourovskaia A, Folch A.** 2003. Biology on a chip: microfabrication for studying the behavior of cultured cells. *Crit Rev Biomed Eng*. 31(5-6):423-88.

**Liu Q, Zhang J, Sun W, Xie QR, Xia W, Gu H.** 2012. Delivering hydrophilic and hydrophobic chemotherapeutics simultaneously by magnetic mesoporous silica nanoparticles to inhibit cancer cells. *Int J Nanomedicine*. 7:999-1013.

**Lim J, Thiery JP.** 2012. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development*. 139(19):3471-86.

**Low SP, Voelcker NH, Canham LT, Williams KA.** 2009. The biocompatibility of porous silicon in tissues of the eye. *Biomaterials*. 30(15):2873-80.

**Luegmayer E, Glantschnig H, Varga F, Klaushofer K.** 2000. The organization of adherens junctions in mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) and their modulation by triiodothyronine and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Histochem Cell Biol*. 113(6):467-78.

## M

**MacDonald PN, Baudino TA, Tokumaru H, Dowd DR, Zhang C.** 2001. Vitamin D receptor and nuclear receptor coactivators: crucial interactions in vitamin D-mediated transcription. *Steroids*. 66(3-5):171-6.

**Mackie EJ, Tatarczuch L, Mirams M.** 2011. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *J Endocrinol*. 211(2):109-21.

- Mackiewicz Z, Niklińska WE, Kowalewska J, Chyczewski L.** 2011. Bone as a source of organism vitality and regeneration. *Folia Histochem Cytobiol.* 49(4):558-69.
- Mancini T, Casanueva FF, Giustina A.** 2008. Hyperprolactinemia and prolactinomas. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 37(1):67-99.
- Manolagas SC.** 2010. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocr Rev.* 31(3):266-300.
- Manolagas SC, Spiess YH, Burton DW, Deftos LJ.** 1983. Mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced stimulation of alkaline phosphatase in cultured osteoblast-like cells. *Mol Cell Endocrinol.* 33(1):27-36.
- Manso-Silvan M, Messina GML, Montero I, Satriano C, García-Ruiz JP, Marletta G.** 2009. Aminofunctionalization and Sub-Micrometer Patterning on Silicon Through Silane Doped Agarose Hydrogels *J. Mater. Chem.* 19, 5226.
- Manso-Silván M, Valsesia A, Ceccone G, Rossi F.** 2004. Activation of PCL surface by ion beam treatment to enhance protein adsorption. *J. Bioact. Compat. Polym.* 19:287-299.
- Manso-Silvan M, Valsesia A, Hasiwa M, Gilliland D, Ceccone G, Rossi F.** 2007. Surface characterization of biopolymer micropatterns processed by ion-beam modification and PECVD. *Chemical Vapor Deposition.* 13(5):211-218.
- Marcellini S, Bruna C, Henríquez JP, Albistur M, Reyes AE, Barriga EH, Henríquez B, Montecino M.** 2010. Evolution of the interaction between Runx2 and VDR, two transcription factors involved in osteoblastogenesis. *BMC Evol Biol.* 10:78.
- Mathieu PS, Lobo EG.** 2012. Cytoskeletal and focal adhesion influences on mesenchymal stem cell shape, mechanical properties, and differentiation down osteogenic, adipogenic, and chondrogenic pathways. *Tissue Eng Part B Rev.* 18(6):436-44.
- McLean KM, Johnson G, Chatelier RC, Beumer GJ, Steele JG, Griesser HJ.** 2000. Method of immobilization of carboxymethyl-dextran affects resistance to tissue and cell colonization. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 18(3-4):221-234.
- Menezes GC, Miron-Mendoza M, Ho CH, Jiang H, Grinnell F.** 2008. Oncogenic Ras-transformed human fibroblasts exhibit differential changes in contraction and migration in 3D collagen matrices. *Exp Cell Res.* 314(16):3081-91.
- Montecino M, Stein GS, Cruzat F, Marcellini S, Stein JL, Lian JB, van Wijnen AJ, Arriagada G.** 2007. An architectural perspective of vitamin D responsiveness. *Arch Biochem Biophys.* 460(2):293-9.
- Morales O, Faulds MH, Lindgren UJ, Haldosén LA.** 2002. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits GH-induced expression of SOCS-3 and CIS and prolongs growth hormone signaling via the Janus kinase (JAK2)/signal transducers and activators of transcription (STAT5) system in osteoblast-like cells. *J Biol Chem.* 277(38):34879-84.
- Muñoz-Noval A, Sánchez-Vaquero V, Punzón Quijorna E, Torres-Costa V, Gallach D, González-Méndez L, Montero I, Martín-Palma RJ, Climent Font A, García-Ruiz JP, Manso-Silván M.** 2012. Aging of porous silicon in physiological conditions: cell adhesion modes on scaled 1D micropatterns. *J Biomed Mater Res A.* 100(6):1615-22.
- Muñoz-Noval A, Sánchez-Vaquero V, Torres-Costa V, Gallach D, Ferro-Llanos V, Serrano JJ, Manso-Silván M, García-Ruiz JP, del Pozo F, Martín-Palma RJ.** 2011. Hybrid luminescent/magnetic nanostructured porous silicon particles for biomedical applications. *J Biomed Opt.* 16(2):025002.

# N

**Nabavi N, Urukova Y, Cardelli M, Aubin JE, Harrison RE.** 2008. Lysosome dispersion in osteoblasts accommodates enhanced collagen production during differentiation. *J Biol Chem.* 283(28):19678-90.

**Nabeshi H, Yoshikawa T, Arimori A, Yoshida T, Tochigi S, Hirai T, Akase T, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, Itoh N, Yoshioka Y, Tsutsumi Y.** 2011. Effect of surface properties of silica nanoparticles on their cytotoxicity and cellular distribution in murine macrophages. *Nanoscale Res Lett.* 6(1):93.

**Ni P, Fu S, Fan M, Guo G, Shi S, Peng J, Luo F, Qian Z.** 2011. Preparation of poly(ethylene glycol)/polylactide hybrid fibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Int J Nanomedicine.* 6:3065-75.

# O

**Ogueta S, Muñoz J, Obregon E, Delgado-Baeza E, García-Ruiz JP.** 2002. Prolactin is a component of the human synovial liquid and modulates the growth and chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol.* 190(1-2):51-63.

**Ogueta S, Olazabal I, Santos I, Delgado-Baeza E, García-Ruiz JP.** 2000. Transgenic mice expressing bovine GH develop arthritic disorder and self-antibodies. *J Endocrinol.* 165(2):321-8.

**Okada M, Makino A, Nakajima M, Okuyama S, Furukawa S, Furukawa Y.** 2010. Estrogen Stimulates Proliferation and Differentiation of Neural Stem/Progenitor Cells through Different Signal Transduction Pathways. *Int J Mol Sci.* 11(10):4114-23.

**Olazabal IM, Muñoz JA, Rodríguez-Navas C, Alvarez L, Delgado-Baeza E, García-Ruiz JP.** 2009. Prolactin's role in the early stages of liver regeneration in rats. *J Cell Physiol.* 219(3):626-33.

**Ormandy CJ, Camus A, Barra J, Damotte D, Lucas B, Buteau H, Edery M, Brousse N, Babinet C, Binart N, Kelly PA.** 1997. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev.* 11(2):167-78.

**Otto WR, Rao J.** 2004. Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif.* 37(1):97-110.

# P

**Papadopoulou AK, Papachristou DJ, Chatzopoulos SA, Pirttiniemi P, Papavassiliou AG, Basdra EK.** 2007. Load application induces changes in the expression levels of Sox-9, FGFR-3 and VEGF in condylar chondrocytes. *FEBS Lett.* 581(10):2041-6.

**Paredes R, Arriagada G, Cruzat F, Villagra A, Olate J, Zaidi K, van Wijnen A, Lian JB, Stein GS, Stein JL, Montecino M.** 2004. Bone-specific transcription factor Runx2 interacts with the 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 receptor to up-regulate rat osteocalcin gene expression in osteoblastic cells. *Mol Cell Biol.* 24(20):8847-61.

**Phinney DG. 2007.** Biochemical heterogeneity of mesenchymal stem cell populations: clues to their therapeutic efficacy. *Cell Cycle*. 6(23):2884-9.

**Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284(5411):143-7.

**Pols HA, Birkenhäger JC, Foekens JA, van Leeuwen JP. 1990.** Vitamin D: a modulator of cell proliferation and differentiation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 37(6):873-6.

**Pountos I, Giannoudis PV. 2005.** Biology of mesenchymal stem cells. *Injury*. 36 Suppl 3:S8-S12.

## **R**

**Racz A, Barsony J. 1999.** Hormone-dependent translocation of vitamin D receptors is linked to transactivation. *J Biol Chem*. 274(27):19352-19360.

**Reddy AM, Kwak BK, Shim HJ, Ahn C, Lee HS, Suh YJ, Park ES. 2010.** In vivo tracking of mesenchymal stem cells labeled with a novel chitosan-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles using 3.0T MRI. *J Korean Med Sci*. 25(2):211-9.

**Rentsch C, Hess R, Rentsch B, Hofmann A, Manthey S, Scharnweber D, Biewener A, Zwipp H. 2010.** Ovine bone marrow mesenchymal stem cells: isolation and characterization of the cells and their osteogenic differentiation potential on embroidered and surface-modified polycaprolactone-co-lactide scaffolds. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 46(7):624-34.

**Romero-Prado M, Blázquez C, Rodríguez-Navas C, Muñoz J, Guerrero I, Delgado-Baeza E, García-Ruiz JP. 2006.** Functional characterization of human mesenchymal stem cells that maintain osteochondral fates. *J Cell Biochem*. 98(6):1457-70.

**Roosa SM, Kempainen JM, Moffitt EN, Krebsbach PH, Hollister SJ. 2010.** The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an in vivo model. *Journal of Biomedical Materials Research A* 92(1): 359-368.

## **S**

**Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, Tagliafico E, Ferrari S, Robey PG, Riminucci M, Bianco P. 2007.** Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 131(2):324-36.

**Sakai S, Hashimoto I, Kawakami K. 2007.** Synthesis of an agarose-gelatin conjugate for use as a tissue engineering scaffold. *J Biosci Bioeng*. 103(1):22-6.

**Schofield R. 1978.** The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 4(1-2):7-25.

**Sergeev IN. 2004.** Calcium as a mediator of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced apoptosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 89-90(1-5):419-425.

**Sharili AS, Allen S, Smith K, Hargreaves J, Price J, McGonnell I. 2011.** Expression of Snail2 in long bone osteosarcomas correlates with tumour malignancy. *Tumour Biol*. 32(3):515-26.



**Sheehy EJ, Buckley CT, Kelly DJ.** 2011. Chondrocytes and bone marrow-derived mesenchymal stem cells undergoing chondrogenesis in agarose hydrogels of solid and channelled architectures respond differentially to dynamic culture conditions. *J Tissue Eng Regen Med.* 5(9):747-758.

**Smink JJ, Leutz A.** 2012. Instruction of mesenchymal cell fate by the transcription factor C/EBP $\beta$ . *Gene.* 497(1):10-7.

**Stein GS, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein JL, Javed A, Montecino M, Zaidi SK, Young D, Choi JY, Gutierrez S, Pockwinse S.** 2004. Nuclear microenvironments support assembly and organization of the transcriptional regulatory machinery for cell proliferation and differentiation. *J Cell Biochem.* 91(2):287-302.

**Stein GS, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, Javed A, Zaidi SK, Young DW, Choi JY, Pockwinse SM.** 2004 (A). Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene.* 23(24):4315-29.

**Stevens MM.** 2008. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials today.* 11(5):18-25.

**Stine RR, Matunis EL.** 2013. JAK-STAT Signaling in Stem Cells. *Adv Exp Med Biol.* 786:247-67.

**Stock UA, Vacanti JP.** 2001. Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med.* 52:443-51.

## **T**

**Tagami T, Lutz WH, Kumar R, Jameson JL.** 1998. The interaction of the vitamin D receptor with nuclear receptor corepressors and coactivators. *Biochem Biophys Res Commun.* 253(2):358-63.

**Tasciotti E, Liu X, Bhavane R, Plant K, Leonard AD, Price BK, Cheng MM, Decuzzi P, Tour JM, Robertson F, Ferrari M.** 2008. Mesoporous silicon particles as a multistage delivery system for imaging and therapeutic applications. *Nat Nanotechnol.* 3(3):151-7.

**Taskiran D, Evren V.** 2011. Stimulatory effect of 17 $\beta$ -estradiol on osteogenic differentiation potential of rat adipose tissue-derived stem cells. *Gen Physiol Biophys.* 30(2):167-74.

**Théry M.** 2010. Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *J Cell Sci.* 123(Pt 24):4201-13.

**Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA.** 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 139(5):871-90.

## **U**

**Umek RM, Friedman AD, McKnight SL.** 1991. CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch. *Science.* 251(4991):288-92.

## V

**Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atayde A, Langer R.** 1988. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J Pediatr Surg.* 23(1Pt 2):3-9.

**van de Loosdrecht AA, Beelen RH, Ossenkoppele GJ, Broekhoven MG, Langenhuijsen MM.** 1994. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J Immunol Methods.* 174(1-2):311-20.

**Vats A, Tolley NS, Buttery LD, Polak JM.** 2004. The stem cell in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Br.* 86(2):159-64.

**Verma NK, Dourlat J, Davies AM, Long A, Liu WQ, Garbay C, Kelleher D, Volkov Y.** 2009. STAT3-stathmin interactions control microtubule dynamics in migrating T-cells. *J Biol Chem.* 284(18):12349-62.

**Villagra A, Cruzat F, Carvalho L, Paredes R, Olate J, van Wijnen AJ, Stein GS, Lian JB, Stein JL, Imbalzano AN, Montecino M.** 2006. Chromatin remodeling and transcriptional activity of the bone-specific osteocalcin gene require CCAAT/enhancer-binding protein beta-dependent recruitment of SWI/SNF activity. *J Biol Chem.* 281(32):22695-706.

**Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J, Aguila HL.** 2004. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood.* 103(9):3258-64.

## W

**Wang F, Gao F, Lan M, Yuan H, Huang Y, Liu J.** 2009. Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells. *Toxicol In Vitro.* 23(5):808-15.

**Wang F, Hui H, Barnes TJ, Barnett C, Prestidge CA.** 2010. Oxidized mesoporous silicon microparticles for improved oral delivery of poorly soluble drugs. *Mol Pharm.* 7(1):227-36.

**Wang Q, Li H, Xie H, Fu M, Guo B, Ding Y, Li W, Yu H.** 2013. 25-Hydroxyvitamin D3 attenuates experimental periodontitis through downregulation of TLR4 and JAK1/STAT3 signaling in diabetic mice. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 135:43-50.

**Wang W, Ma N, Kratz K, Xu X, Li Z, Roch T, Bieback K, Jung F, Lendlein A.** 2012. The influence of polymer scaffolds on cellular behaviour of bone marrow derived human mesenchymal stem cells. *Clin Hemorheol Microcirc.* 52(2-4):357-73.

**Wang X, Wang Y, Gou W, Lu Q, Peng J, Lu S.** 2013. Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. *Int Orthop.*

**Wang Y, Wang Y, Wang L, Che Y, Li Z, Kong D.** 2011. Preparation and evaluation of magnetic nanoparticles for cell labeling. *J Nanosci Nanotechnol.* 11(5):3749-56.

**Wang Y, Zhu J, DeLuca HF.** 2012. Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys.* 523(1):123-33.

**Williams JM, Adewunmi A, Schek RM, Flanagan CL, Krebsbach PH, Feinberg SE, Hollister SJ, Das S.** 2005. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials*. 26(23):4817-27.

**Woeckel VJ, Alves RD, Swagemakers SM, Eijken M, Chiba H, van der Eerden BC, van Leeuwen JP.** 2010. 1 $\alpha$ ,25-(OH) $_2$ D $_3$  acts in the early phase of osteoblast differentiation to enhance mineralization via accelerated production of mature matrix vesicles. *J Cell Physiol*. 225(2):593-600.

## **y**

**Yamaguchi M, Weitzmann MN.** 2012. High dose 1,25(OH) $_2$ D $_3$  inhibits osteoblast mineralization in vitro. *Int J Mol Med*. 29(5):934-8.

**Yanoso-Scholl L, Jacobson JA, Bradica G, Lerner AL, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Zuscik MJ, Awad HA.** 2010. Evaluation of dense polylactic acid/beta-tricalcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 95(3):717-26.

**Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, Johnstone B.** 1998. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*. 80(12):1745-57.

**Yoshida CA, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K, Yamana K, Zanma A, Takada K, Ito Y, Komori T.** 2004. Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev*. 18(8):952-63.

## **Z**

**Zabala MT, García-Ruiz JP.** 1989. Regulation of expression of the messenger ribonucleic acid encoding the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase in liver and small intestine of lactating rats. *Endocrinology*. 125(5):2587-93.

**Zaidi SK, Young DW, Choi JY, Pratap J, Javed A, Montecino M, Stein JL, van Wijnen AJ, Lian JB, Stein GS.** 2005. The dynamic organization of gene-regulatory machinery in nuclear microenvironments. *EMBO Rep*. 6(2):128-33.

**Zannettino AC, Paton S, Arthur A, Khor F, Itescu S, Gimble JM, Gronthos S.** 2008. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J Cell Physiol*. 214(2):413-21.

**Zhang Z, Wang H, Ikeda S, Fahey F, Bielenberg D, Smits P, Hauschka PV.** 2010. Notch3 in human breast cancer cell lines regulates osteoblast-cancer cell interactions and osteolytic bone metastasis. *Am J Pathol*. 177(3):1459-69.



## **8. Anexo**



## PUBLICACIONES

- "Design and characterization of biofunctional magnetic porous silicon flakes", Acta Biomaterialia. 9(4):6169-6176. 2013  
Álvaro Muñoz-Noval, R. García, D. Ruiz Casas, D. Losada Bayo, **Vanessa Sánchez-Vaquero**, Vicente Torres-Costa, Raúl J. Martín-Palma, M.A. García, Josefa P. García-Ruiz, J.J. Serrano Olmedo, J.F. Muñoz Negrete, F. del Pozo Guerrero, Miguel Manso-Silván.
- "Aging of porous silicon in physiological conditions: cell adhesion modes on scaled 1D micropatterns", J Biomed Mater Res A. 100(6):1615-22. 2012  
Álvaro Muñoz-Noval, **Vanessa Sánchez-Vaquero**, Esther Punzón-Quijorna, Vicente Torres-Costa, Darío Gallach-Pérez, Laura González-Méndez, Isabel Montero, Raúl J. Martín-Palma, Aurelio Climent-Font, Josefa P. García-Ruiz, Miguel Manso-Silván.
- "Nanostructured porous silicon micropatterns as a tool for substrate-conditioned cell research". Nanoscale Res Lett. 7(1):396. 2012  
Esther Punzón-Quijorna, **Vanessa Sánchez-Vaquero**, Álvaro Muñoz-Noval, María Jesús Pérez-Roldán, Raúl J Martín-Palma, Francois Rossi, Aurelio Climent-Font, Miguel Manso-Silván, Josefa P. García-Ruiz, Vicente Torres-Costa.
- "Engineering of silicon surfaces at the micro- and nanoscales for cell adhesion and migration control". International Journal of Nanomedicine. 7:623-630. 2012  
Vicente Torres-Costa, Gonzalo Martínez-Muñoz, **Vanessa Sánchez-Vaquero**, Álvaro Muñoz Noval, Laura González-Méndez, Esther Punzón-Quijorna, Darío Gallach-Pérez, Miguel Manso-Silván, Aurelio Climent-Font, Josefa P. García-Ruiz, Raúl J Martín-Palma.
- "Tissue engineering using novel rapid prototyped Diamond-like Carbon coated scaffolds" Plasma Processes and Polymers. 9:98-107. 2012  
Andrés Díaz Lantada, José Luis Endrino, **Vanessa Sánchez-Vaquero**, Adolfo Mosquera, Pilar Lafont and Josefa P. García Ruiz.
- "Hybrid luminescent/magnetic nanostructured porous silicon particles for biomedical applications". Journal of Biomedical Optics. 16(2):025002. 2011  
Álvaro Muñoz-Noval, **Vanessa Sánchez-Vaquero**, Vicente Torres-Costa, Darío Gallach, Vicente Ferro-Llanos, José Javier Serrano, Miguel Manso-Silván, Josefa P. García-Ruiz, Francisco del Pozo and Raúl J. Martín Palma.
- "Silicon-based hybrid luminiscent/magnetic porous nanoparticles for biomedical applications". Journal of Nanophotonics. Vol 5. 2011  
Álvaro Muñoz-Noval, **Vanessa Sánchez-Vaquero**, Vicente Torres-Costa, Darío Gallach, Miguel Manso-Silván, Josefa P. García-Ruiz and Raúl J. Martín Palma.
- "Optimized allylamine deposition for improved pluripotential cell culture". Vacuum 85:1071-1075. 2011  
Esther Punzón-Quijorna, **Vanessa Sánchez-Vaquero**, Álvaro Muñoz-Noval, Darío Gallach, A. Climent Font, G. Ceccone, R. Gago, Josefa P. García-Ruiz, Miguel Manso-Silván.
- "Preparation, modification and cellular evaluation of PEG-PEGd supports with titania nanoparticle loads". Surface and Interface Analysis. 2010.  
**Vanessa Sánchez-Vaquero**, Álvaro Muñoz-Noval, Nuria Tejera-Sánchez, María Jesús Pérez Roldán, Andrea Valsesia, Giacomo Ceccone, Josefa P. García-Ruiz, Miguel Manso-Silván, Francois Rossi.
- "Characterization and cytocompatibility of hybrid aminosilane-agarose hydrogel scaffolds". Biointerphases, 5(2):23-29. 2010  
**Vanessa Sánchez-Vaquero**, Cristina Satriano, Nuria Tejera-Sánchez, Laura González-Méndez, Josefa P. García-Ruiz and Miguel Manso-Silván.

- “Evaluation of plasma modified polycaprolactone honeycomb scaffolds by human mesenchymal stem cells cultured in vitamin d differentiation medium”. Plasma Processes and Polymers. 7, 794-801. 2010  
Fabio Formosa, **Vanessa Sánchez-Vaquero**, Carmen Rodríguez-Navas, Álvaro Muñoz-Noval, Nuria Tejera-Sánchez, Miguel Manso-Silván, Josefa P. García-Ruiz, Giovanni Marletta.